NEUE BIOTIN-ANTIMETABOLITEN AUS STREPTOMYCETEN

Fermentation und Wirkungsweise von Amiclenomycin-Peptiden

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

MATTHIAS POETSCH

aus Hannover

1984

NEUE BIOTIN-ANTIMETABOLITEN AUS STREPTOMYCETEN

Fermentation und Wirkungsweise von Amiclenomycin-Peptiden

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Matthias Poetsch
aus Hannover

1984

Die Natur macht nichts Überflüssiges
und nichts umsonst

Aristoteles

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1984

Dekan : Professor Dr. H.U. Seitz

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. R.G. Werner

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Eberhard Karls Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner durchgeführt. Ihm gilt für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Diskussionen und beständige Unterstützung mein besonderer Dank.

Ich danke auch Herrn Priv.- Doz. Dr. R. G. Werner, Abteilung Biochemie - Zellbiologie, Dr.Karl Thomae GmbH, sehr herzlich für die ausgezeichnete Betreuung und engagierte Diskussionsbereitschaft.

Zu danken habe ich weiterhin der Geschäftsleitung, insbesondere Herrn Prof. Dr. H. Machleidt, und Herrn Dr. H. Goeth der Firma Dr. Karl Thomae GmbH für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit. Herrn H.B. Sick danke ich für seine engagierte Mitarbeit bei biologischen und chemischen Untersuchungen.

Die Feinreinigung und Strukturanalyse der Amiclenomycin-Peptide wurde gleichzeitig von Herrn A. Kern am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Organische Chemie I, Prof. Dr. E. Bayer, im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. G. Jung im Rahmen einer Dissertation durchgeführt. Für die Daten der Strukturanalyse und die Bereitstellung der Reinsubstanzen sei ihm herzlich gedankt.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	**EINLEITUNG**	1
II.	**MATERIAL UND METHODEN**	5
1.	Chemikalien	5
2.	Nährmedien	6
3.	Mikroorganismen	8
3.1.	Produktionsstämme	8
3.2.	Testorganismen	8
4.	Stammhaltung und-aufbewahrung	10
5.	Kulturführung Tü 2460 / Tü 2605	11
5.1.	Sporengewinnung	11
5.2.	Schüttelkulturen	11
5.3.	'resting-cell' Kulturen	11
5.4.	Bestimmung des Temperaturoptimums	12
5.5.	Kulturen in Rührkesseln	12
5.5.1.	Impfgutvermehrung	12
5.5.2.	Aufbau der Versuchsanlagen; Meß- und Regeleinheiten	13
5.5.3	Kulturführung im batch-Verfahren	14
6.	Fermentationsanalysen	16
6.1.	Definition und Ermittlung der Wachstums-parameter	16
6.2.	Abluftanalyse	17
6.3.	Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in der Kulturlösung	18

Seite

6.4. Wachstumsmessungen 19
6.5. Glycerinbestimmung 19
6.6. Glukosebestimmung 20
6.7. Phosphatbestimmung 20
6.8. Stickstoffbestimmung 20
6.9. Dünnschichtchromatographie 21

7. Plattendiffusionstests 21
7.1. Herstellung von Testplatten 22
7.2. Quantitative Bestimmung der Acm-Peptide 22
7.3. Kreuztest 23
7.4. Bioautographie 23

8. Aufnahme eines Wirkspektrums 23
8.1. Antibakterielle Aktivität 23
8.2. Antifungische Aktivität 'in vitro' 24
8.3. Antifungische Aktivität 'in vivo' und Resistenzinduktion bei Pflanzen 24
8.4. Mitogenitätstest 25
8.5. Test an Dinophilus gyrociliatus 25

9. Verdünnungsreihentest 26

10. Biophotometerversuche 26

III. **ERGEBNISSE**

A. Zur Taxonomie der Produzentenstämme 27

B. Fermentationsoptimierung 32

1. Optimierung der Kulturführung 32

Seite

1.1. Temperatur 32
1.2. pH-Wert 33
1.3.. Belüftung und Durchmischung 33

2. Optimierung der Nährlösung 35
2.1. N-Quellen-Variation und Stickstoff-Regulation 37
2.2. C-Quellen-Variation und Kohlenstoff-Repression 40
2.3. Einfluß von anorganischem Phosphat 40
2.4. Spurenelemente 42

3. Batch-Fermentationen im Labormaßstab 43

4. Batch-Fermentation im technischen Maßstab 48

5. Isolierung der Wirkstoffe 49

6. Chemisch-physikalische Charakterisierung 52

C. Zur Wirkungsweise der Acm-Peptide 61

1. Untersuchungen zum Antagonismus 61

2. Wirkprofil der Acm-Peptide 65
2.1. Antibakterielle Aktivität 65
2.2. Antifungische Aktivität 67
2.3. Wirkung gegen Protozoen 68
2.4. Mitogene Wirkung 69

3. Toxizität 69

4. Versuche am Biophotometer 70

Seite

5. Transport der Acm-Peptide 71

6. Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-beziehungen 75

7. Intrazelluläre Aktivierung durch Peptidasen 75

IV. **DISKUSSION** 81

A. Taxonomie 81
B. Fermentation 81
C. Wirkungsweise 86

V. **ZUSAMMENFASSUNG** 95

VI. **LITERATURVERZEICHNIS** 97

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Acm	Amiclenomycin
ATCC	American Type Culture Collection
BC	Stammsammlung der Fa. Thomae GmbH, Biberach/Riss
BTM	Bakterientrockenmasse
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
DAPA	7,8-Diaminopelargonsäure
dpp	Dipeptid-Permease
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
ention.	entionisiert
Fa.	Firma
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMC	Culture Collection of the Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, Japan
IR	infrarot
KAPA	7-Keto-8-Aminopelargonsäure
KF	Kulturfiltrat
M II	Stammsammlung des Institutes für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, Universität Tübingen
MHK	Minimale Hemmkonzentration
opp	Oligopeptid-Permease
pep	Peptidase
P_i	anorganisches Phosphat
SA	Schrägagar
ssp	Subspecies
TOR	Triornithin-resistent
Tü	Stammsammlung des Institutes für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen
Upm	Umdrehungen pro Minute
vvm	Volumen Luft/Volumen Nährlösung /Minute

Die Abkürzungen der Aminosäuren und Peptide erfolgte nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB-Joint-Commission (1984).

I. EINLEITUNG

Antimetaboliten sind nach der klassischen Definition von WOOLLEY (1952) isosterische Enzyminhibitoren, die Mangelsymptome eines essentiellen Metaboliten hervorrufen. Da heute nur solche Metabolite als essentiell bezeichnet werden, die von dem entsprechenden Organismus nicht selbst synthetisiert werden können, wurde diese Definition für Antagonisten primärer Stoffwechselprodukte wie zum Beispiel Aminosäuren später erweitert: Nach PRUESS & SCANNEL (1974) sind Antimetaboliten organische Verbindungen, die in geringen Konzentrationen Mangelerscheinungen bezüglich Wachstum und Überleben eines Organismus hervorrufen, welche durch Gabe eines oder mehrerer gewöhnlicher Metabolite aufgehoben werden können.

Untersuchungen zum Prinzip der kompetitiven Hemmung führten bereits 1929 zu der Erkenntnis, daß strukturanaloge Verbindungen als Antimetaboliten in Mikroorganismen bestimmte Stoffwechselwege hemmen können, jedoch wurde der Mechanismus der kompetitiven Hemmung zunächst nicht generell akzeptiert. Erst 1940, als WOODS die Aufhebung der bakteriostatischen Wirkung der Sulfonamide durch p-Aminobenzoesäure gelang, wurde die weitere Suche nach Analoga anderer bekannter bakterieller Faktoren enorm stimuliert (HOCHSTER & QUASTEL, 1963).

Das damals weit verbreitete klassische Screening nach WAKSMAN, bei dem eine möglichst enge Korrelation zwischen erstem Test und späterer Anwendung angestrebt wurde, erfaßte aber gerade nicht die Gruppe der Antimetaboliten gegen Verbindungen des Primärstoffwechsels. Ihre Wirkung war in Diffusionstests auf komplexen Nährböden durch Bestandteile des Substrates überdeckt worden.

Erst mit der Einführung neuer Testsysteme wie Differenztest (HANKA, 1960, 1968), Kreuztest (ZÄHNER et al. 1960) oder Gegendiffusionsmethode (STAPLEY et al., 1967) wurde ein systematisches Suchen nach diesen Antimetaboliten ermöglicht. Damit wurde gleichzeitig das weite Feld der nichtklassischen Screeningmethoden eröffnet, bei denen der erste Test zum Beispiel mit einer neuen Auswahl der Testorganismen, zellfreien Systemen und sogar rein chemischen Methoden nicht mehr notwendigerweise in direktem Zusammenhang mit der späteren Anwendung stand (ZÄHNER, 1977; HAMILL, 1977; ZÄHNER et al. 1982).

Mit dem Differenztest fanden KOROBKOVA et al. (1970) unter 756 Actinomyceten nicht weniger als 25 Produzenten von Leucin-Antagonisten. HANKA (1973) detektierte nach dieser Methode in 5 % aller untersuchten (11600) Kulturen Antimetaboliten von Vitaminen, Aminosäuren und Nukleinsäuren, davon 2 % 'in vivo'-aktive Verbindungen. Über 1 % der Antimetaboliten zeigten neue chemische Strukturen und immerhin 2 gelangten in die klinische Prüfung.

Rund 8000 Sekundärmetabolite sind bis heute beschrieben, von denen aber nur ein kleiner Teil breite Anwendung im Pflanzenschutz, der Tierernährung und in der Humanmedizin findet (ZÄHNER, 1982). Für das breite Spektrum der Krankheitserreger stehen noch nicht genügend Antibiotika zur Verfügung, und durch das vermehrte Auftreten von Bakterienstämmen, die gegen die vorhandenen Wirkstoffe zum Teil mehrfachresistent sind (LEBEK, 1969), besteht immer ein großer Bedarf an neuen Antibiotika vor allem im medizinischen Anwendungsbereich gegen gram-negative Bakterien, Pilze, Protozoen und 'Würmer' sowie gegen entsprechende phytopathogene Organismen, Milben und Insekten im Bereich des Pflanzenschutzes (ZÄHNER, 1977).

In einem Screening nach Sekundärmetaboliten mit neuen Grundstrukturen bei der Firma Thomae, Biberach/Riss, wurden ver-

schiedene, aus Bodenproben isolierte Stämme der Gattung Streptomyces in einem Differenztest mit multiresistenten Keimen geprüft. Dabei fiel der Stamm Tü 2460 als Produzent eines Antimetaboliten auf, dessen antibakterielle Wirkung durch Vitamin E aufgehoben werden konnte. Nach der Optimierung der Fermentation (POETSCH, 1982) konnte bei weiteren Untersuchungen zur Wirkungsweise durch den Nachweis einer Verunreinigung des Vitamin E Präparates der Antagonismus auf Spuren darin enthaltenen Biotins zurückgeführt werden.

Viele Antivitamine sind bis heute beschrieben worden, jedoch sind wenige Strukturanaloge der entsprechenden Vitamine, mit der Ausnahme von Biotin (PRUESS & SCANNELL, 1974). In Tabelle 1 ist eine Reihe von Biotin-Antimetaboliten aufgeführt. Diese Liste ließe sich um viele Strukturanaloge, Homologe und Derivate des Biotins erweitern, die von GYÖRGY (1954) in einer Übersicht dargestellt wurden; die meisten dieser Verbindungen wirken als Antivitamine, deren biologische Aktivität nach WEBER & PFISTER (1982) auf der vollständigen oder teilweisen Aufhebung der Wirkung des Vitamins beruhen.

Tabelle 1: Biotin-Antimetaboliten

Biotinsulfon	DITTMER et al.	(1944)
Norbiotin und Homobiotin	RUBIN & SCHEINER	(1949)
α-Dehydrobiotin	HANKA et al.	(1966)
α-Methylbiotin und α-Methyldesthiobiotin	HANKA et al.	(1972)
Imidazolidoncapronsäure	DITTMER & DuVIGNEAUD	(1947)
Actithiazic acid	KAWASHIMA et al.	(1956)
Amiclenomycin	OKAMI et al.	(1974)
Stravidin und MSD-235 S2	STAPLEY et al.	(1963)
Adenin	IWAHARA & KANEMARU	(1975)

Seit Biotin mit dem Vitamin H, dem Bios-Faktor (KÖGL & TÖNNIS, 1936), identifiziert werden konnte (GYÖRGY et al. 1940) ist auch die Bedeutung der antagonisierenden Wirkung von Avidin, einem Polypeptid aus Eiklar (EAKIN et al. 1941; GREEN, 1975), bekannt, das durch die Hemmung der biotinkatalysierten Carboxylierungsreaktionen zu einer Reihe von Mangelerkrankungen führen kann (MOSS & LANE, 1971; ROTH, 1981). Avidin wurde aber wegen seines enzymatischen Charakters nicht als Antimetabolit bezeichnet (WOOLLEY, 1963). Aus Streptomyceten wurde ein Polypeptid mit sehr ähnlicher Wirkung isoliert (CHAIET et al., 1963; TAUSIG & WOLF, 1964; CHAIET & WOLF, 1964), das auch wegen seiner erstaunlichen Homologie zu Avidin in Struktur und Wirkung (DeLANGE & HUANG, 1971) Streptavidin genannt wurde.

Neben dem Stamm Tü 2460 wurde im Screening mit dem Differenztest ein weiterer Streptomycet gefunden, Tü 2605, der ebenfalls Biotin-Antimetaboliten produzierte. In Fortführung der Diplomarbeit sollte zunächst die Fermentation dieser Stämme optimiert werden, mit dem Ziel, ausreichende Mengen eines hinreichend sauberen Rohproduktes zu gewinnen, um die Strukturanalyse und einen Vergleich der Wirkstoffe beider Produzenten zu ermöglichen. Weiterhin sollte ein Verfahren zur möglichst ertragreichen Herstellung der Produkte bis in den technischen Maßstab entwickelt und mit den daraus isolierten Reinsubstanzen die Wirkungsweise der Antibiotika untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden analysenreine Substanzen der Fa. Merck AG, Darmstadt, verwendet.

Bachem, Bubendorf, Schweiz	Triornithin
Boehringer Mannheim	Glycerin, UV-Test
BP-Chemicals, Düsseldorf	Polyol PPG 2025
Deutsche Ajinomoto GmbH, Hamburg	Asparaginmonohydrat
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto Agar
Fluka, Buchs, Schweiz	Avidin
	Natriumlauryl-alkoholsulfonat
Hedinger GmbH & Co, Stuttgart-Wangen	Na-Hypochlorit
Oxoid Deutschland, Wesel	Fleisch- und Malzextrakt
Riedel DeHaen, Seelze-Hannover	Magnesiumhydrogenphosphat-3-Hydrat
Hoffman-La Roche, Grenzach-Wyhlen	Diagnostica-Test: Glukose, anorganischer Phosphor
Roth KG, Karlsruhe	Glycerin (98 %)
Serva, Feinbiochemika,	Ampicillin, Chloramphenicol,
	Jodacetat
	L-Isoleucin
	Peptide (siehe Tabelle 21)
	Tween 80
Heidelberg	MES
	MOPS
	PIPES
Sigma Chemical Company, St. Louis, USA	DAP
Thomae GmbH, Biberach/Riss	α-Tocopherolacetat

2. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert (121°C, 202,6 kPa, 20 min) oder sterilfiltriert (SLGS 025 BS, 0,22 um, Millipore GmbH, Neu-Isenburg). Der pH-Wert wurde jeweils vor dem Sterilisieren mit 3 N NaOH und 3 N H_2SO_4 eingestellt.

a) Medien für Stammhaltung und Testplatten

Hefe-Malz Agar (HA)

Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
Glukose	4 g
Agar	15 g
ention. Wasser	1000 ml
pH 7,2	

Normalagar (NA)

Fleischextrakt	8 g
Pepton	10 g
NaCl	3 g
Na_2HPO_4	2 g
Agar	15 g
ention. Wasser	1000 ml
pH 7,2	

Braun Flexner Agar (BFA)
nach BRAUN (1931)

Na-Lactat	5,0 ml
$Na_2SO_4 \cdot H_2O$	5,0 g
$K_2HPO_4 \cdot H_2O$	0,5 g
$MgCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,2 g
Glukose	10 g
Agar	15 g
ention. Wasser	1000 ml
pH 7,2	

Czapek Dox Agar (CD)
verändert nach CZAPEK (1903)

Glukose	30 g
$(NH_4)_2SO_4$	2,5 g
KH_2PO_4	1 g
CaCl	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,01 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,01 g
Agar	15 g
ention. Wasser	1000 ml
pH 7,2	

Medium 9 (M9)

Glukose	4 g
NH_4Cl	0,7 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	5,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
NaCl	0,4 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,25 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,15 g
ention. Wasser	1000 ml
pH 7,2	

b) Produktionsmedien

NL 6

Glycerin (98 %)	20 ml
Glukose	5 g
K_2HPO_4	1,74 g
$(NH_4)_2SO_4$	10 g
Spurenelemente-Lösung	1 ml
ention. Wasser	1000 ml
pH 5,5	

$MgHPO_4 \cdot 3\ H_2O$	10 g
(Zugabe nach 34 Stunden; nur in besonderen Fällen)	

Spurenelemente-Lösung

$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 g
NaCl	1 g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,02 g
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,01 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,4 g
ention. Wasser	1000 ml

NL 111.2

Fleischextrakt	20 g
Malzextrakt	20 g
Leitungswasser	1000 ml
pH 7,2	

NL RC

entspricht NL 6 ohne K_2HPO_4 und $MgHPO_4$

3. Mikroorganismen

3.1. Antibiotikaproduzenten

Die Produzenten der Acm-Peptide, Streptomyces venezuelae Tü 2460 und Streptomyces lavendulae Tü 2605, wurden aus Erdproben isoliert, die in Tel Jericho, Israel, resp. in Eßlingen (Altmühl), Deutschland, gesammelt worden waren. Sie werden im folgenden kurz als Tü 2460 und Tü 2605 bezeichnet.

3.2. Testorganismen

		Temp. (°C)
Eubacteriales, Gram-positiv		
Bacillus subtilis COHN	ATCC 6051	37
Micrococcus luteus	ATCC 1599	37
Mycobacterium smegmatis (TREVISAN) LEHMAN & NEUMANN	ATCC 607	37
Staphylococcus aureus SG 511	Thomae, Biberach	37
Staphylococcus aureus E 88	Thomae, Biberach	37
Streptococcus pyogenes	Thomae, Biberach	37
Eubacteriales, Gram-negativ		
Acinetobacter calcoaceticus	ATCC 11959	37
A. calcoaceticus	ATCC 15473	37
Enterobacter cloacae	ATCC 13047	37
E. cloacae P 99	Thomae, Biberach	37
Escherichia coli TEM	ATCC 11775	37
E. coli 11775	Thomae, Biberach	37
E. coli K-12 W 1485	ATCC 12435	37
E. coli K-12 D 448 (opp^-)	M II	37
E. coli K-12 D 449 (opp^-, dpp^-)	M II	37
E. coli K-12 MTM 22	M II 875	37
E. coli K-12 MTM 110	M II 876	37
E. coli K-12 BR 158	M II	37
E. coli 9200	M II	37
E. coli BC 29 beta	Thomae, Biberach	37
E. coli 12593/74	Thomae, Biberach	37

Klebsiella pneumoniae	ATCC 10031	37
K. pneumoniae 1082 E	Thomae, Biberach	37
K. pneumoniae	BC 6	37
Proteus inconstans	ATCC 25825	37
Proteus mirabilis	BC 17	37
Salmonella typhimurium LT2 (LOEFFLER) CASTELLANI & CHALMERS	M II	37
S. typhimurium LT2 - TN 852	M II	37
S. typhimurium LT2 - TN 858	M II	37
S. typhimurium LT2 - TN 859	M II	37
S. typhimurium LT2 - TN 860	M II	37
S. typhimurium LT2 - TN 861	M II	37
Serratia marcescens BIZIO KOCUR	ATCC 13880	37
S. marcescens	BC 8	37
Pseudomonadales		
Pseudomonas aeruginosa	BC 19	37
Pseudomonas aeruginosa Hbg	Thomae, Biberach	37
Xanthomonas spec.	Celamerck	RT
Actinomycetales		
Streptomyces avidinii	DSM 40526	27
S. lavendulae ssp. amiclenomycini	IMC MD 580-S1	27
S. viridochromogenes (KRAINSKY) WAKSMAN et HENRICI	Tü 57	27
Pilze		
Oomycetes		
Phytophtora palmivora	Tü 666	27
P. spec.	Celamerck	RT
Plasmopara spec.	Celamerck	RT
Saprolegnia asterophora De BARY	CBS 180.44	24
Zygomycetes		
Mucor mucedo	Tü 181	27
Mucor miehei COONEY et EMERSON	Tü 284	27

Eumycetes		
Ascomycetes und Deuteromycetes		
Alternaria kikuchina TANAKA	Tü 169	27
Aspergillus niger	Tü 503	37
Botrytis cinerea PERSOON ex FRIES	Tü 157	24
Botrytis spec.	Celamerck	RT
Candida albicans	Tü 164	27
Erysiphe spec.	Celamerck	RT
Fusarium solani	Tü 8014	27
Hansenula anomala (HANSEN) SYDOW	Tü 279	27
Helminthosporium spec.	Celamerck	RT
Lipomyces lipofer		27
Mycothypha africana	Tü 260	27
Paecilomyces variotii BAINIER	Tü 137	37
Penicillium notatum	Tü 136	27
Penicillium puberulum	Tü 8006	27
Pichia farinosa (LINDNER) HANSEN	Tü 291	27
Pyricularia oryzae	Tü 693	27
Rhizoctonia solani	Tü 535	27
Rhodotorula rubra	Tü 8093	27
Saccharomyces cerevisiae HANSEN	Tü 125	27
Trichophyton mentagrophytes (ROBIN) BLANCHARD	Tü 510	27
Basidiomycetes		
Coprinus cinereus GRAY	Tü 637	24
Puccinia spec.	Celamerck	RT

4. Stammhaltung und -aufbewahrung

Alle Eubakterien, Pseudomonaden, Actinomyceten und Pilze wurden mit einer Impföse auf Schrägagarröhrchen (SA) mit HA-Agar geimpft, 15 Stunden - ggf. bis zu 72 Stunden - bei den oben angegebenen Temperaturen (II.3.2.) inkubiert und bei 4 ^{o}C gelagert. Nach 6 Wochen wurden die Kulturen erneuert.

Außerdem wurden die Organismen als Suspension (Actinomyceten als Sporensuspension, siehe II.5.1) in Glycerin (60 %) bei -20 °C eingefroren.

5. Kulturführung Tü 2460 / Tü 2605

5.1. Sporengewinnung

Vorkulturen der Streptomyceten wurden wie unter II.5.2. beschrieben in NL 111.2 24 Stunden bei 27 °C inkubiert. Mit je 1 ml einer Vorkultur wurde die Oberfläche von 200 ml schräg in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gegossenen HA-Agars geimpft und 7 Tage bis zur guten Sporulation bei 27 °C inkubiert. Die Sporen wurden dann mit tweenhaltiger Saline (1 Tropfen /ml) abgeschwemmt, in einem Kolben mit Glasperlen auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 120 Upm geschüttelt, um die Sporenketten zu zerschlagen, und über Glaswattefilter gereinigt. Nach Waschen mit kalter Saline (3 x , Zentrifugieren bei 3000 Upm) wurden die Sporen in Glycerin (60 %) suspendiert (OD_{578} = 0,7 entsprechend 3 x 10^8 Sporen/ml) und bei -20 °C eingefroren.

5.2. Schüttelkulturen

Alle Schüttelkulturen wurden in Erlenmeyerkolben mit einer Schikane auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ 106 bzw. Typ RL 1 TK, Fa. Infors AG, Basel, Schweiz) bei 120 Upm inkubiert. 500 ml-Kolben enthielten 100 ml, 100 ml-Kolben 20 ml Nährlösung und ggf. 1 Tropfen Polyol (zur Schaumbekämpfung). Die Kulturen wurden mit einer Impföse vom SA geimpft.

5.3. 'resting-cell' Kulturen

Zur Bereitung von Impfmaterial für eine bestimmte Anzahl von 'resting-cell' Kulturen wurde zunächst eine entsprechende Anzahl Vorkulturen (je 100 ml NL 111.2; 24 Stunden bei 30°C

und 120 Upm inkubiert) über eine Filternutsche steril abgesaugt und auf dem Filter 3 mal mit Saline gewaschen. Nach Abschaben des Mycels vom Filter und Resuspendieren in Saline (50 ml je 100 ml Vorkultur) konnten damit die 'resting-cell' Kulturen beimpft werden: Zugabe von 50 ml Mycelsuspension zu je 50 ml doppelt konzentriertem RC-Medium. Die Kulturführung erfolgte dann wie unter II.5.2 beschrieben.

5.4. Bestimmung des Temperaturoptimums

Zur Ermittlung der otimalen Wachstums- und Produktions-Temperatur wurde ein TEMPERATURE GRADIENT INCUBATOR (Modell TN-3, Fa. Toyo Kagaku Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) benutzt. 30 Winkelreagenzgläser, gefüllt mit 10 ml NL 111.2, wurden in Intervallen von 1 °C über einen Gradienten von 20 bis 50 °C verteilt, mit 0,5 ml einer 24 Stunden alten Vorkultur in NL 111.2 geimpft und 52 Stunden unter oszillierendem Schütteln (Stufe'2') inkubiert. Alle 12 Stunden wurden Proben entnommen und im Plattendiffusionstest die biologische Aktivität bestimmt. Nach 52 Stunden wurde die Bakterientrockenmasse bestimmt (siehe II.6.4).

5.5. Kulturen in Rührkesseln

5.5.1. Impfgutvermehrung

Die Produzentenstämme wurden als Impfmaterial für Fermenterkulturen in Schüttelkolben (siehe II.5.2) 48 Stunden bei 30 °C in NL 111.2 inkubiert, die Kulturen nach 48 Stunden vereinigt und in den Reaktor gegeben. Bei der Verwendung von definierten Medien im Produktionsfermenter wurde die komplexe Nährlösung dieser Vorkulturen mit einem Büchnertrichter abgesaugt, das Mycel dreimal mit steriler Saline gewaschen und dann, suspendiert in einem definierten Volumen NL 6, in den Reaktor gegeben.

Als Impfmaterial für einen 200 l-Reaktor wurde die gesamte Kultur eines Vorfermenters (Typ b 20) in NL 6 nach 48 Stunden Inkubation direkt über eine sterile Schlauchleitung in den Produktionsreaktor (Typ b 200) gepumpt.

5.5.2. Aufbau der Versuchsanlagen; Meß- und Regeleinheiten

Für die Optimierungsversuche und die Produktion von Acm-Peptiden wurden verschiedene Bioreaktoren eingesetzt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bioreaktoren

Reaktortyp	Hersteller	Arbeitsvolumen	Rührsystem
Biostat S	B	3 l	B
Biostat E	B	10 l	B
Reaktor b 20	G	20 l	U
Reaktor b 25	G	25 l	U
Reaktor b 200	G	200 l	U

Hersteller : B: Braun-Melsungen AG, Melsungen
G: Giovanola Frères SA, Monthey, Schweiz
Rührsystem : B: Blattrühr-Turbine
U: Umwurf-Intensor-System

Zur Grundausstattung gehörten in der Regel:
- Temperaturregelkreis mit Thermofühler PT 100, Thermostat, Kühlkreislauf und Thermometer
- Sterilfilter für Zu- und Abluft
- Abluftkühler
- Strömungsmessrohr (Rotameter)
- Drehzahlregelung und -erfassung
- drucküberlagerte pH-Elektrode (Typ 465-VT, Fa. Ingold,

Urdorf-Zürich, Schweiz) mit einem proportional-integral wirkenden Grenzwertregler und pH-Registrierung
- Säure- und Laugevorlagegefäße; Zuführung über einen elektronischen Proportionalgeber und Membranpumpen (FE 211, Fa. Braun-Melsungen AG), Pumpenköpfe F = 1 bzw. F = 0,1 für Biostat S
- polarographische Sauerstoffelektrode (Modell IL 531, Fa. Ingold) mit Verstärker und Registriereinheit
- pO_2 Regeleinheit (proportional-integral-Regler)
- 6-Farben-Punktdrucker
- Hand-Probenahmeventil

Zur Ergänzung konnten weitere Geräte angeschlossen werden:
- Laborgasmeter (Fa. Wohlgroth, Zürich, Schweiz)
- Manometer zur Messung des Reaktorinnendruckes
- Sauerstoff-Analysengerät (Oxygor 6N, Fa. Maihak, Hamburg)
- Kohlendioxid-Analysengerät (Unor 6N, Fa. Maihak, Hamburg)

Die Sterilisation der Reaktoren einschließlich Medien erfolgte im Autoklaven (Biostat S) bzw. 'in situ' (Biostat E, Reaktoren b 20, b 25 und b 200) 30 Minuten bei 121 °C und 202,6 kPa. Nach dem Abkühlen und Erreichen der Betriebstemperatur sowie konstantem Signal der pO_2-Elektrode wurden die Reaktoren mit Vorkulturen beimpft.

5.5.3. Kulturführung im batch-Verfahren

Batch Kulturen in Rührkesseln wurden mit vegetativen Zellen aus Vorkulturen der Produzentenstämme Tü 2460 bzw. Tü 2605 (Impfmenge 0,5 % v/v; Herstellung siehe II.5.2) gestartet. Wenn nicht anders angegeben wurden in Intensor-Umwurf-Reaktoren folgende Parameter eingehalten:

Drehzahl	: 1000 Upm
Belüftung	: 0,5 vvm
Temperatur	: 30 °C
Nährlösung	: NL 6
pH	: 5,5*)
Kulturdauer	: 50 - 70 Stunden

*) Der pH Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 6,5 eingestellt, beim Absinken in den sauren Bereich auf 5,5 begrenzt und nach Erreichen dieses Wertes mit der pH-Regeleinheit durch Zuführen von 3 N NaOH und 3 N H_2SO_4 konstant gehalten.

Nach Beendigung der Fermentation wurde das Mycel mit einer Filterpresse abgetrennt, das Kulturfiltrat gewonnen und das darin enthaltene Produkt isoliert und gereinigt (siehe III.B.5.).

Während der Fermentation wurden folgende Messwerte kontinuierlich registriert:

Kulturtemparatur	[°C]
pH-Wert	
Belüftungsrate	[vvm]
Propellerdrehzahl	[Upm]
Sauerstoffpartialdruck in der Kulturlösung	[%]
Sauerstoff-Volumenkonzentration in der Abluft	[%]
Kohlendioxid-Volumenkonzentration in der Abluft	[%]
Säure/Lauge-Zugabe (Impulszähler)	

Zur weiteren Charakterisierung des Kulturverlaufes wurden diskontinuierlich im Abstand von mehreren Stunden Proben über ein sterilisierbares Ventil entnommen und den unter II.6. und II.7.2. beschriebenen Analysen unterzogen.

6. Fermentationsanalysen

6.1. Definition und Ermittlung der Wachstumsparameter

Der metabolische Zustand der Streptomyceten während der Fermentation wurde mit den im folgenden aufgeführten Parametern charakterisiert (AIBA et al., 1973; PIRT, 1975; WANG et al., 1979; BERGTER, 1983). Die Variablen bedeuten:

x = Bakterientrockenmasse (BTM) [g/l]
t = Kulturzeit [h]
c_{O2} = aktuelle Sauerstoffkonzentration in der Kulturlösung [g/l]
c_{O2}^{m} = maximale Sauerstoffkonzentration in der Kulturlösung [g/l]
QO_2 = absolute O_2-Aufnahmerate [$gO_2/l \cdot h$]
QCO_2 = absolute CO_2-Bildungsrate [$gCO_2/l \cdot h$]

1) spezifische Wachstumsrate μ:

$$\mu = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x} \approx \frac{\Delta x}{\Delta t} \cdot \frac{1}{x} \qquad [1/h]$$

$$= \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1} \cdot \frac{1}{x_1 + ((x_2 - x_1)/2)}$$

2) spezifische Sauerstoffaufnahmerate q_{O2}:

$$q_{O_2} = \frac{dO_2}{dt} \cdot \frac{1}{x} \qquad [g\ O_2\ /\ g\ BTM \cdot h]$$

$$= QO_2 \cdot \frac{2}{x_2 + x_1}$$

(Definition und Ermittlung von QO_2 [$gO_2/l \cdot h$] und QCO_2 [$gCO_2/l \cdot h$] siehe Abschnitt II.6.2. .)

3) volumetrischer Sauerstoff-Übergangskoeffizient $K_L \cdot a$:

$$K_L \cdot a = \frac{QO_2}{c^m_{O2} - c_{O2}} \qquad [1/h]$$

4) respiratorischer Quotient RQ:

$$RQ = \frac{dCO_2}{dO_2} \approx \frac{CO_2\text{-Abgabe}}{O_2\text{-Aufnahme}}$$

$$\approx \frac{QCO_2 \cdot 32.0}{QO_2 \cdot 44.01}$$

5) Molenbruch ψ_i:

Verhältnis der Molzahl n_i der Komponente i zur Gesamtmolzahl aller Gase im Gemisch.

$$\psi_i = \frac{n_i}{\Sigma n_i}$$

ferner gilt:

$$\sum_{j=1}^{k} \psi_i = \frac{1}{\Sigma n} \cdot \sum_{j=1}^{k} n_j = 1$$

6.2. Abluftanalyse

In der Reaktorabluft wurden die Volumenkonzentrationen des nicht veratmeten Restsauerstoffs und des gebildeten Kohlendioxids (FIECHTER & von MEYENBURG, 1968) mit folgenden Geräten kontinuierlich gemessen:

Sauerstoff: **Oxygor 6N, Fa. Maihak AG, Hamburg**

Meßprinzip: Konzentrationsabhängige Bildung eines Staudruckes und dadurch bedingte meßbare Widerstandsveränderung aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften des Sauerstoffs.

Kohlendioxid: Unor 6N, Fa. Maihak AG, Hamburg
Meßprinzip: Konzentrationsabhängige Infrarotabsorption des Kohlendioxids.

Die Austauschraten für Sauerstoff und Kohlendioxid wurden mit diesen Meßwerten nach der Methode der quasistationären Stickstoffbilanz berechnet:

$$QO_2 = \frac{V_L}{V_R} \cdot \frac{32 \cdot 10^3}{22.4} \cdot \left(\psi_{O_2} - \frac{\psi_{N_2} \cdot \psi'_{O_2}}{(1 - \psi'_{CO_2} - \psi'_{O_2})} \right)$$

$$QO_2 = [g\ O_2/l \cdot h]$$

$$QCO_2 = \frac{V_L}{V_R} \cdot \frac{44.01 \cdot 10^3}{22.4} \cdot \left(\frac{\psi_{N_2} \cdot \psi'_{CO_2}}{(1 - \psi'_{CO_2} - \psi'_{O_2})} - \psi_{CO_2} \right)$$

$$QCO_2 = [g\ O_2/l \cdot h]$$

(V_L = Gaseintrag Nm^3/h ; V_R = aktuelles Reaktorvolumen [l])

6.3. Bestimmung der O_2-Konzentration in der Kulturlösung

Im Druckbereich der Bioreaktoren folgen Gase dem Henry'schen Gesetz, wenn der Gesamtdruck über der Flüssigphase, der Gaspartialdruck in der zugeführten Gasphase, die Eigenschaften des Kulturmediums und die Temperatur als konstant angenommen werden und das Kulturmedium als reines Wasser betrachtet wird. So wurde der von der Sauerstoffelektrode gelieferte Meßwert nach HENRY (1803) in absolute Konzentrationswerte umgerechnet:

$$c^m_{O2} = \frac{32}{18} \cdot \rho \cdot \psi_{O2} \cdot H \cdot p_G \cdot \qquad [g/l]$$

H = Henry-Konstante (berechnet nach BESKOV, 1962)
P_G = Gesamtdruck des Gases über der Flüssigkeit (manometrisch gemessen)
ρ = Dichte des Wasers [g/cm^3]

Das konstante Meßsignal der Sauerstoffelektrode bei intensiver Belüftung vor dem Animpfen wurde als Sättigungskonzentration c^m_{O2} angenommen (pO_2 = 100 %).

6.4. Wachstumsmessungen

Zur Bestimmung der Bakterientrockenmasse (BTM) wurden 5 ml einer Kulturprobe von Tü 2460 bzw. Tü 2605 über zuvor abgewogene Filter (MN 615, Ø 4,5 cm, Fa. Machery & Nagel, Düren) abgesaugt. Wie auch zur Bestimmung des Leergewichtes wurden die Filter über Nacht bei 100 °C getrocknet, danach 1 Stunde zur Angleichung an die Luftfeuchtigkeit bei Raumtemperatur (RT) ausgebreitet und gewogen. Die Differenz beider Messungen ergab die Bakterientrockenmasse.

6.5. Glycerinbestimmung

Glycerin wird unter Katalyse von Glycerokinase (GK) durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Glycerin-3-phosphat phosphoryliert (1).

$$\text{Glycerin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{Glycerin-3-phosphat} + \text{ADP} \qquad (1)$$

Das entstandene Adenosin-5'-diphosphat (ADP) wird mittels Pyruvatkinase (PK) durch Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt (2).

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat} \qquad (2)$$

Bei anschließender Hydrierung des Pyruvates durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) in Gegenwart von

Lactat-Dehydrogenase (LDH) wird NADH zu NAD^+ oxidiert (3).

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + NAD^+ \qquad (3)$$

Die verbrauchte Menge NADH ist der Glycerin-Menge äquivalent und wurde aufgrund der Absorption bei 366 nm bestimmt. Für diese Analyse wurde eine Testkombination der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet.

6.6. Glukosebestimmung

Der Glukosegehalt im Kulturfiltrat wurde in einer enzymatischen Reaktion (Reagenziensatz der Fa. Merck, Darmstadt) durch Oxidation mit Glukose-Dehydrogenase (Gluc-DH) nachgewiesen (4).

$$\text{ß-D-Glukose} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Gluc-DH}} \text{D-Gluconolacton} + \text{NADH} + H^+ \qquad (4)$$

Die Menge des gebildeten NADH ist der Glukose-Konzentration proportional und kann durch Absorptionsmessung bei 366 nm bestimmt werden.

6.7. Phosphatbestimmung

Anorganische Phosphationen setzen in saurem Milieu aus Malachitgrün-Molybdat-Chelat (Reagenziensatz der Fa. Roche Diagnostica, Basel, Schweiz) Malachitgrün frei. Die Farbintensität ist der Phosphatkonzentration direkt proportional und wurde photometrisch (578 nm) gemessen.

6.8. Stickstoffbestimmung

a) Gesamtstickstoff

Der Gesamt-Stickstoffgehalt (Ges.Stickstoff) im Kulturfiltrat wurde nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt. Nach Aufschluß des Kulturfiltrates mit konz. H_2SO_4 lag der zuerst

organisch gebundene Stickstoff quantitativ als Ammoniumsulfat vor. Der daraus im alkalischen Milieu freigesetzte Ammoniak wurde durch Destillation in eine Vorlage übergetrieben und dort durch Titration quantitativ nachgewiesen.

b) Ammonium-Ionen

Die Bildung eines blauen Indophenolfarbstoffes in Gegenwart von Phenol-Nitroprussid und alkalischer Hypochlorit-Lösung diente zur Bestimmung von NH_4^+-Ionen (resp. $(NH_4)_2SO_4$) nach der Methode von Fawcett & Scott (1960). Variation: Der Testansatz wurde auf ein Endvolumen von 1,2 ml reduziert und in Mikrotitergefäßen durchgeführt.

6.9. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (STAHL, 1967) zum Nachweis von Acm-Peptiden wurden Kieselgelplatten 60 F_{254} der Fa. Merck, Darmstadt, bei Kammersättigung in einem Fließmittel bestehend aus Chloroform / Methanol / H_2O / NH_3-Lösung (17%) im Verhältnis 65 : 35 : 4 : 3 entwickelt. Die Detektion der Acm-Peptide erfolgte nach FAHMY et al. (1960) und van ARX et al. (1976) durch:

a) Ninhydrin-Sprühreagenz: 0,5 g Ninhydrin wurden in 10 ml 1-Butanol und 3 ml Eisessig gelöst.
b) Chlor/TDM-Sprühreagenz: 7,5 g TDM (4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan) wurden in 30 ml Eisessig gelöst, mit 150 ml Wasser verdünnt und filtriert. 15 g Kaliumjodid wurden in 300 ml Wasser gelöst und mit der TDM-Lösung vereint.
c) Bioautographie: siehe II.7.4.

7. Plattendiffusionstest

Die quantitative Bestimmung der Acm-Peptide und Untersuchungen zu ihrer Wirkungsweise wurden in verschiedenen Plattendiffusionstests durchgeführt.

Filterstreifen (0,5 x 6 cm; Fa. Machery & Nagel, Düren, Nr. 615) wurden mit 50 µl bzw. Rondellen (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel, No. 2668/2, Ø 6 mm,) mit 20 µl Testlösung beschickt, getrocknet und auf Testplatten aufgelegt. Nach 15 - 18 Stunden Inkubation konnten die Hemmzonen ausgewertet werden.

7.1. Herstellung von Testplatten

Die Testkeime wurden jeweils in einer Submerskultur (siehe II.5.2.) über Nacht angezogen und mit einem Titer von 3 x 10^3 Zellen/ml in Braun-Flexner Agar (BFA) suspendiert. 4 ml dieses Keimschichtagars wurden dann über 17,5 ml Grundagar (BFA) in Petrischalen gegossen. Zur Aufnahme des Wirkspektrums der Acm-Peptide und für Untersuchungen der Transportwege und Aktivierungsmechanismen wurden diese Testplatten analog unter Verwendung anderer Keime verwendet. Zur Bestimmung der antifungischen Aktivität wurden spezielle Testplatten verwendet (siehe II.8.).

7.2. Quantitative Bestimmung der Acm-Peptide

Während der Fermentationsoptimierung wurde der Gesamt-Wirkstoffgehalt der Kulturen routinemäßig mit Escherichia coli 12593/74, einem Klinikisolat mit Mehrfachresistenz von Prof. LEBEK, Bern, Schweiz, als Standard-Testkeim im Rondellentest durch Messen der Hemmhöfe bestimmt. Zur Erhaltung der Resistenz wurde E. coli 12593/74 auf Platten mit NA-Agar gehalten und bei jeder 3. Passage auf Ampicillin-haltigen (50 µg/ml) Agar überimpft. Eine Unterscheidung der einzelnen Acm-Peptide war mit dieser Methode nicht möglich. Deshalb wird im folgenden stets die Gesamtaktivität der Acm-Peptide BC 1-6 im Kulturfiltrat in Einheiten äquivalent zu 1 mg MeIle-Acm (Acm-Peptide [$mg_{BC\ 1}/l$])als Standard angegeben.

7.3. Kreuztest

Untersuchungen zum Antagonismus und Transport der Acm-Peptide und zur gegenseitigen Beeinflussung verschiedener Substanzen beim Transport in die Zellen wurden in Kreuztests nach BONIFAS (1952) und ZÄHNER & MAAS (1972) ausgeführt. Der Biotin-Antagonismus wurde außerdem routinemäßig im 'counter-diffusion disk assay' nach STAPLEY et al. (1967) nachgewiesen.

7.4. Bioautographie

Über eines von zwei parallel entwickelten Dünnschichtchromatogrammen (siehe II.6.9.) wurde ein Tesafilmstreifen geklebt und in 3 mm lange Abschnitte unterteilt. Nach Inkubation dieser Abschnitte in Plattendiffusionstests wurden die R_f-Werte der biologisch aktiven Komponenten bestimmt und mit dem anderen Chromatogramm (Detektion mit Chlor/TDM-Sprühreagenz) verglichen.

8. Aufnahme eines Wirkspektrums

Die Empfindlichkeit von Bakterien und Pilzen (einschließlich Hefen) 'in vitro' gegen die Acm-Peptide wurde in Plattendiffusionstests (II.7.) bestimmt. Die Inkubationstemperaturen für die einzelnen Testorganismen sind in Abschnitt II.3.2. angegeben.

8.1. Antibakterielle Aktivität

Alle Bakterien wurden nach Anzucht in einer Vorkultur in Braun-Flexner Flüssigmedium (18 Stunden) als vegetative Zellen (Streptomyceten als Sporensuspension) in die Keimschicht der Testplatten (II.7.1) eingegossen. Die bakteriostatische Wirkung wurde durch die Messung der Hemmhöfe um die Filterrondellen bestimmt. Die minimalen Hemmkonzentra-

tionen der einzelnen Wirkstoffe wurden im Reihenverdünnungstest (II.9.) ermittelt.

8.2. Antifungische Aktivität 'in vitro'

Die wachstumshemmende Wirkung der Acm-Peptide gegen Pilze und Hefen wurde mit drei Methoden (V,S,R) im Plattendiffusionstest auf CD-Agar bestimmt:

V: durch Anzucht einer Vorkultur (V) (18 Stunden) und Eingießen der vegetativen Zellen in die Keimschicht.

S: durch Suspendieren von Sporen (S) in der Keimschicht Hierzu wurden Sporen einer gut gewachsenen Schrägagarkultur mit 6 ml Na-Laurylsulfat (50 mg/l) abgeschwemmt, über ein Glaswattefilter gereinigt, in 100 ml Keimschichtmedium (CD-Agar) suspendiert und zu je 4 ml über 17,5 ml CD-Grundagar gegossen.

R: durch Test an einer Riesenkolonie nach HÜTTER et al. (1965) und BETINA et al. (1966). Mit einem Korkbohrer (Ø 6 mm) wurden Mycelstückchen langsam wachsender, nicht sporulierender Pilze ausgestochen und auf Testplatten mit frischem CD-Agar gesetzt. Nach Inkubation bis zu einem Koloniedurchmesser von 3 cm wurden die Testrondellen in 1 mm Abstand zum Wachstumsrand aufgelegt und nach 24 Stunden erneuter Inkubation die Hemmzonen abgelesen.

8.3. Antifungische Wirkung 'in vivo' und Resistenzinduktion bei Pflanzen

Die Testpflanzen (Phaseolus-Bohnen, Vicia-Bohnen, Tomaten, Gurken, Gerste, Weizen und Hafer) wurden einer kombinierten Behandlung durch Angießen (Wurzel) und Spritzen (Blatt) in 2 bis 4 Wiederholungen unterzogen und zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung infiziert. Die Bonitierungsnoten bedeuten:

1 = 0 - 10 % Befall
2 = 11 - 40 % Befall
3 = 41 - 100 % Befall

8.4. Mitogenitätstest

An Human- und Mäuselymphozyten Kulturen wurde eine mögliche mitogene Wirkung (CYBULLA et al., 1980; BESSLER et al., 1982) der Acm-Peptide 'in vitro' nach JOHNSON et al. (1983) untersucht.

Dazu wurden Human-Lymphozyten nach BÖYUM (1968) in einer Ficoll- Gradientenzentrifugation aus Blut isoliert und in 133 µl RPMI 1640 Medium (MOORE et al., 1967, Gibco, Europe, Glasgow, Scotland) unter Zusatz von $5 \cdot 10^{-5}$ M ß-Mercaptoethanol, je 50 U/ml Penicillin und Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 3,3 % foetalem Kälberserum (Seromed, München) pro Gefäß in Mikrotiterplatten suspendiert (Titer: $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Mäuse-Lymphozyten wurden aus der Milz von 7-Wochen alten Balb/c-Mäusen gewonnen und analog in 133 µl des gleichen Mediums suspendiert (Titer: $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml).

Unter Zugabe von 50 µl Mitogen resp. Antibiotikum wurde bei 37 °C inkubiert und nach 24 Stunden je Gefäß 25 µl ^3H - Thymidin (entsprechend 0,5 µCi/Kultur) zugefügt. Nach insgesamt 48 Stunden Kulturzeit wurden die Zellen geerntet (Titer: Mäuselymphozyten: $1,12 \times 10^6$ Zellen/ml; Humanlymphozyten: $1,12 \times 10^6$ Zellen/ml) und die Einbauraten des radioaktiv markierten Thymidins in die DNA der Lymphozyten bestimmt (Meßgerät: Mark II Liquid Scintillation System, Modell 4693 Nuclear, Chicago, USA; Meßzeit 1 min/Probe).

8.5. Test an Dinophilus gyrociliatus

Die Versuchsanordnung für die Prüfung der Acm-Peptide auf Toxizität gegen den Urringelwurm Dinophilus gyrociliatus und

ihre Wirkung gegen Protozoen (Eucoccidium dinophili) wurde von TEJMAR-KOLAR & ZÄHNER (1984) beschrieben. Einige Archanneliden wurden mit den Protozoen infiziert und alle Tiere (außer den Kontrollen) den Acm-Peptiden ausgesetzt. Alle 24 Stunden wurde die Vitalität der Wirte und der Parasiten überprüft. Für die Durchführung des Versuches danke ich Frau Dr. Tejmar-Kolar.

9. Verdünnungsreihentest

Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der Acm-Peptide wurden in Mikrotiterplatten (Falcon 3040, Fa. Becton Dickinson, Oxnard, England) bestimmt. Diese enthielten pro Napf 0,2 ml BFA (Nährlösung ohne Agar) supplementiert mit (pro ml) 5o µg Ca-Panthotenat, 50 µg Thiamin, 0,25 µg Folsäure, 50 µg Niacin, 25 µg p-Aminobenzoesäure, 50 µg Pyridoxol-Hydrochlorid und 25 µg Riboflavin, 0,01 ml Inokulum (Endkonzentration: 10^4 Zellen /ml) und 0,01 ml einer Verdünnungsreihe der Acm-Peptide (Endkonzentrationen: 1024 - 0,007 µg/ml). Nach 15 Stunden Inkubation wurde diejenige Konzentration in der Verdünnungsreihe als MHK bezeichnet, bei der gerade kein Wachstum des Keimes festgestellt werden konnte.

10. Biophotometerversuche

Die Zeitabhängigkeit der biologischen Wirkung der Acm-Peptide wurde mit einem Eppendorf-Photometer mit einem Umlaufautomat für 24 Küvetten (Typ KV-3, Fa. Thomae, Biberach) bestimmt. 10 ml Nährlösung (BFA ohne Agar) je Küvette wurden mit dem Testkeim E.coli 12593/74 zu einer Endkonzentration von 10^4 Zellen/ml geimpft und bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Die resultierenden 24 Wachstumskurven wurden mit einem 12-Kanal Punktschreiber (Polykomp, Fa. Hartmann und Braun, Frankfurt) aufgezeichnet.

III. Ergebnisse

A. Zur Taxonomie der Produzentenstämme

Unter verschiedenen Stämmen der Gattung Streptomyces, die aus Bodenproben isoliert wurden, zeigten zwei Stämme - Tü 2460 und Tü 2605 - wachstumshemmende Wirkung gegen gramnegative Bakterien auf Minimalmedien. Die Bestimmung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften dieser Antibiotikaproduzenten erfolgte nach HÜTTER (1967), PRIDHAM & TRESNER (1974), NONOMURA (1974), PRIDHAM & GOTTLIEB (1948) und SHIRLING & GOTTLIEB (1966).

a) Merkmale von Tü 2460:

Sporenoberfläche	:	glatt bis warzig
Chromogenität	:	Melanin-Reaktion positiv
Luftmycelfarbe	:	cinnamomeus
Sporenkettenmorphologie	:	RF (Rectus-Flexibilis)
Sporengröße	:	0,6-0,7 x 0,8-1,0 µm

Abb. 1: Luftmycel Tü 2460

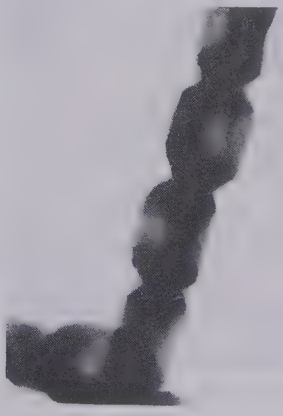


Abb. 2: Sporenketten Tü 2460

Nach dem Artkonzept von ETTLINGER et al. (1958) ist Tü 2460 mit diesen Kennzeichen der Art Streptomyces venezuelae zuzuordnen (LOEFFLER, persönliche Mitteilung, 1982).

Im Test auf Kohlenstoff-Dissimilation konnte Tü 2460 nur Glukose, Galaktose und Glycerin für das Wachstum verwerten. Beim Vergleich der morphologischen und physiologischen Eigenschaften mit Literaturdaten (s.o.) (Tabelle 2) wurde die beste Übereinstimmung mit Streptomyces xanthophaeus gefunden, der nach HÜTTER (1967) synonym ist zu S. venezuelae. Ergebnis der Bestimmung: Streptomyces venezuelae Tü 2460.

Tabelle 2: Kohlenstoffdissimilation von Tü 2460

Kohlenstoff-Quelle	Tü 2460	S.ven.[a)]	S.xan.[b)]	S.xan.[c)]
kein Kohlenstoff	-	-	O	-
D-Arabinose	-	+	-	-
D-Xylose	-	+	-	-
D-Glukose	+	+	+	+
D-Galaktose	+	+	O	O
D-Fruktose	+-	+	-	-
L-Rhamnose	-	+	-	-
Saccharose	-	O	-	-
Cellulose	-	O	O	O
Raffinose	-	-	-	-
m-Inosit	-	-	-	-
D-Mannit	-	-	-	-

+: Wachstum, -: kein Wachstum, +-: indifferent
O: keine Angaben;
a): Streptomyces venezuelae (nach PRIDHAM & TRESNER,1974)
b): S. xanthophaeus (nach PRIDHAM & TRESNER, 1974)
c): S. xanthophaeus (nach NONOMURA, 1974)

b) Merkmale von Tü 2605:

Sporenoberfläche	:	glatt
Chromogenität	:	Melanin-Reaktion positiv
Luftmycelfarbe	:	cinnamomeus
Sporenkettenmorphologie	:	RA (Retinaperculum Apertum)
Sporengröße	:	0,8-1,0 x 1,4-1,8 µm

Der Stamm Tü 2605 wurde aufgrund dieser Eigenschaften der Art Streptomyces lavendulae zugeordnet (LOEFFLER, persönliche Mitteilung, 1983).

Abb. 3: Luftmycel Tü 2605

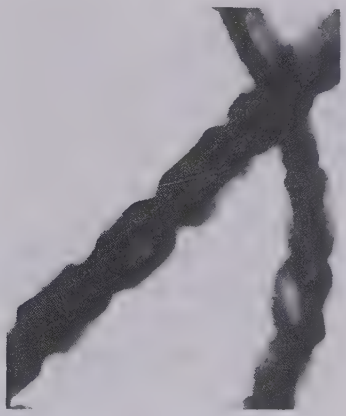


Abb. 4: Sporenketten Tü 2605

Tü 2605 konnte neben Glukose, Galaktose und Glycerin auch Fruktose und Saccharose zum Wachstum verwenden (Tabelle 3) und stimmte beim Vergleich mit Literaturdaten (s.o.) am besten mit S. lavendulae ssp. brasilicus (FALCAO de MORAIS & DALIA MAIA, 1958) überein, der nach HÜTTER (1967) zu S. lavendulae synonym ist.
Ergebnis der Bestimmung: Streptomyces lavendulae Tü 2605.

Tabelle 3: Kohlenstoffdissimilation von Tü 2605

Kohlenstoff-Quelle	Tü 2605	S.lav.ssp.bras.[a]	S.lav.[b]
kein Kohlenstoff	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
D-Glukose	+	+	+
D-Galaktose	+	+	O
D-Fruktose	+	-	+
L-Rhamnose	-	-	-
Saccharose	+	-	-
Cellulose	O	O	O
Raffinose	-	-	-
m-Inosit	-	-	-
D-Mannit	-	-	-

+: Wachstum, -: kein Wachstum, O: keine Angaben

a): Streptomyces lavendulae ssp. brasilicus (nach PRIDHAM & TRESNER, 1974)

b): S. lavendulae (nach NONOMURA, 1974)

Die C-Quellen Spektren haben nur beschränkten systematischen Wert (ZÄHNER & ETTLINGER, 1957), so daß in der Literatur bei verschiedenen Autoren zu bestimmten Referenzstämmen unterschiedliche Angaben zu finden sind. Hier sind die Ergebnisse aber auch für die nachfolgende Fermentationsoptimierung von Bedeutung und geben Anhaltspunkte für die Zusammenstellung der Nährlösungen.

Die Fähigkeit, bestimmte Sekundärmetabolite zu bilden, ist kein speciesspezifisches Merkmal sondern Charakteristikum einzelner Stämme einer Art (UMEZAWA, 1977). So wurde für einen anderen Stamm der Art S. venezuelae z.B. die Bildung

von Chloramphenicol (EHRLICH et al.,1947) beschrieben, das von Tü 2460 nicht produziert wird. Andererseits gehören der Art S.lavendulae alle bisher bekannt gewordenen Produzenten von Actithiazinsäure (GRUNDY et al., 1952) an, einem anderen Biotin-Antimetaboliten, der in Kulturen von Tü 2605 nicht nachgewiesen werden konnte. Tü 2605 konnte auch gegenüber S. lavendulae ssp. amiclenomycini MD-580 S1, einem Produzenten von Amiclenomycin und α-Methyldethiobiotin (HOTTA et al., 1975), aufgrund morphologischer Eigenschaften abgegrenzt werden.

B. Fermentationsoptimierung

1. Optimierung der Kulturführung

1.1. Temperatur

In einem Temperatur-Gradienten von 20 bis 50 °C wurden Wachstum und Antibiotika-Produktion der Stämme Tü 2460 und Tü 2605 in komplexer Nährlösung (NL 111.2 + MES, 100 mM, pH 6,5) beobachtet. Mit den Wachstumskurven (nicht abgebildet) korrelierte die Produktivität, die bei Tü 2460 ein Maximum zwischen 28 und 32 °C durchlief und oberhalb 35 °C auf Null zurückging, während Tü 2605 in einem breiteren Bereich von 20 bis 40 °C sehr hohe Aktivität mit einem Maximum bei 30 °C zeigte (Abb. 5). Für alle weiteren Versuche wurde eine Inkubationstemperatur von 30 °C gewählt.

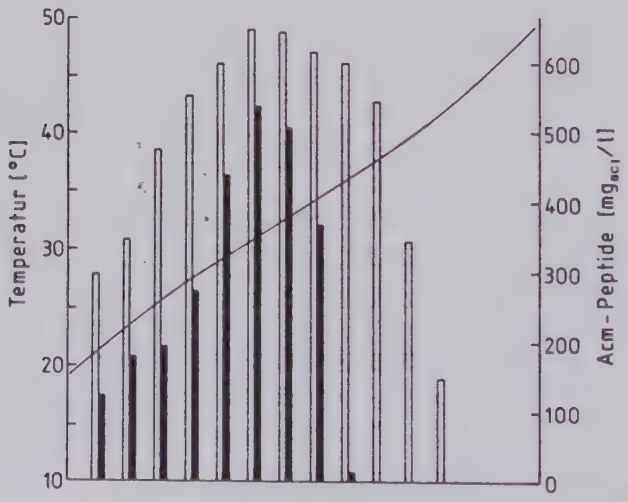


Abb. 5: Produktion der Acm-Peptide in einem Temperatur-Gradienten (———) von 20 bis 50 °C mit Tü 2460 ▮ und Tü 2605 ▯ in NL 111.2 + MES (100 mM), pH 6,5.

1.2. pH-Wert

In wachsenden Submerskulturen der Produzentenstämme in neutral eingestelltem Medium war der pH-Verlauf charakterisiert durch langsames Absinken während der logarithmischen Phase in den sauren Bereich (Ausscheidung organischer Säuren), anschließenden Anstieg in der stationären Phase (Wiederaufnahme dieser Produkte) und zunehmendes Alkalisieren in der Absterbephase. Dabei schwankte der pH in komplexen Medien wie z.B. NL 111.2 in engen Grenzen zwischen 6,5 und 8,0, jedoch wurden schon nach ca. 36 Stunden Werte über pH 7 erreicht und verstärkte Lyse beobachtet. In definierten Minimalmedien (NL 6) ohne Zusatz von Puffersubstanzen wurden dagegen Werte bis pH 3,0 gemessen (unter pH 5,0 kein Wachstum mehr) und in der stationären Phase auch nach mehreren Tagen pH 7 kaum überschritten, womit einer schnellen Lyse der Zellen vorgebeugt werden konnte.

Zur Bestimmung des optimalen pH-Bereiches für die Produktion wurde der Einfluß verschiedener organischer, nicht metabolisierbarer Puffersubstanzen (Morpholinoethansulfonsäure (MES): pH 5,5; Morpholinopropansulfonsäure (MOPS): pH 6,5 und N-Tris(hydroxymethyl-2-aminoethansulfonsäure (TES): pH 7,2; GOOD et al., 1966) in 'resting cell' Kulturen verglichen (Abb. 6). Die höchsten Erträge wurden bei pH 5,5 erreicht, so daß dieser Wert in allen folgenden Kulturen mit MES (in Schüttelkolben) bzw. NaOH und H_2SO_4 (in Rührkesseln) eingestellt wurde.

1.3. Belüftung und Durchmischung

In verschiedenen Reaktortypen wurden die Belüftungsrate und die Rührgeschwindigkeit variiert, um bei möglichst homogener Durchmischung, hohen Stoffübergangszahlen und geringer mechanischer Belastung für die Produzentenstämme gute Wachstumsbedingungen und hohe Produktionsraten zu erzielen.

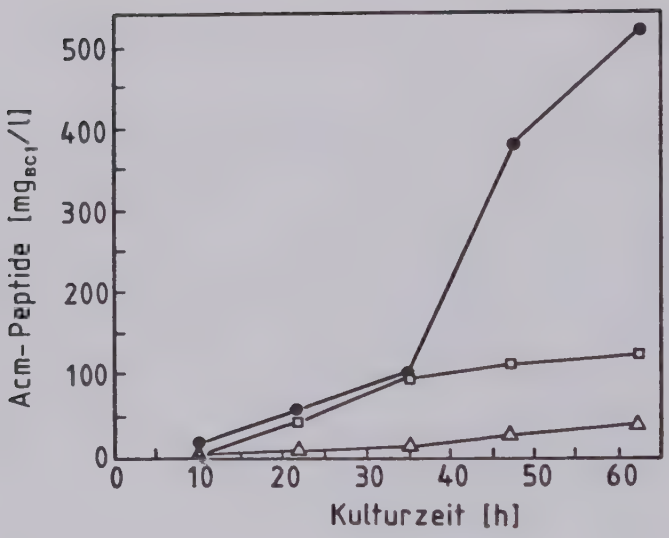


Abb. 6: Produktion der Acm-Peptide mit Tü 2605 in NL 6 bei verschiedenen pH-Werten (—●— : pH 5,5;—□—:pH 6,5; —△— : pH 7,2).

Im Intensor-Umwurfsystem konnte bei einer Belüftungsrate von 0,5 vvm mit der Erhöhung der Propellerdrehzahlen von 800 auf 1000 Upm eine Sauerstofflimitierung überwunden werden (Abb. 7 a-c). Wachstum und Produktion wurden jedoch durch weitere Erhöhung der Drehzahlen auf 1200 Upm oder Steigerung des Luftdurchsatzes bis 1,0 vvm nicht nochmals stimuliert.

Im Turbinen-Rührsystem wurde dagegen erst bei 700 Upm und 1,0 vvm Luftdurchsatz eine ausreichende Sauerstoffversorgung mit vergleichbarem Ertrag gewährleistet (vgl. Abb. 11). Höhere Belüftungsraten wirkten sich nicht positiv aus, und die Drehzahl konnte gerätebedingt nicht über 800 Upm erhöht werden.

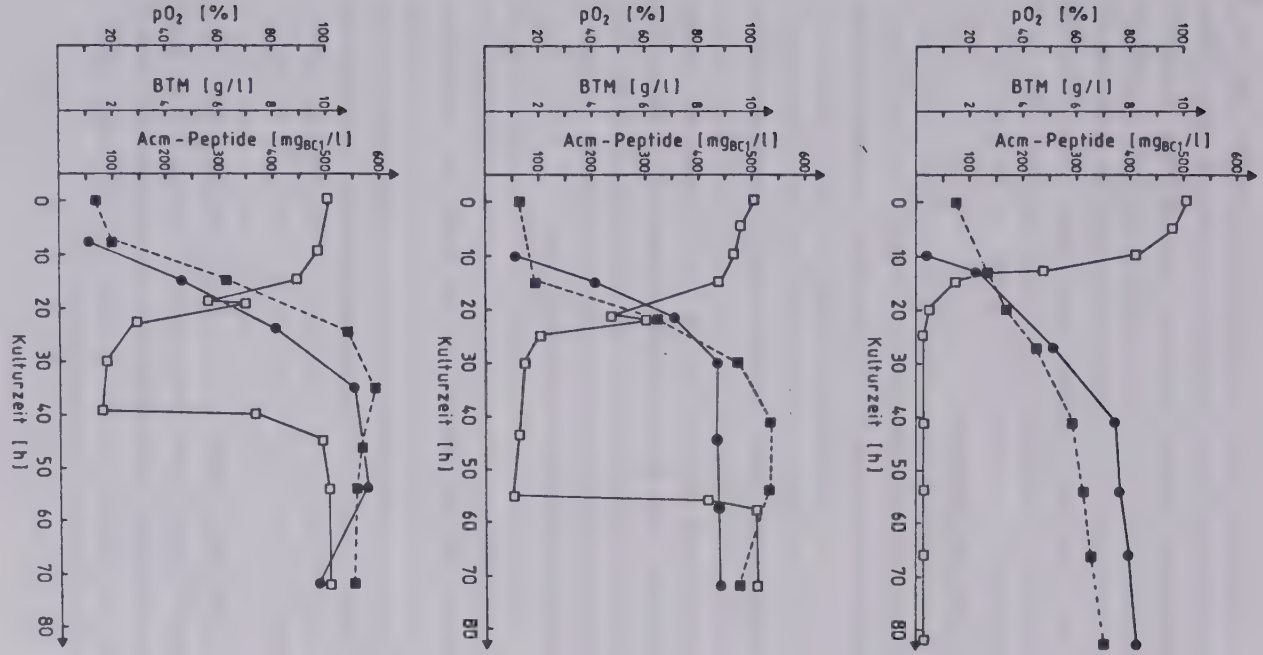


Abb. 7: Einfluß der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium (NL 6) auf das Wachstum von Tü 2605 und die Produktion von Acm-Peptiden im Umwurfreaktor (b 25) bei konstanter Belüftungsrate (0,5 vvm) und verschiedenen Rührgeschwindigkeiten (a: 700 Upm; b: 850 Upm und c: 1000 Upm). pO_2 —□—; BTM ---■---; Acm-Peptide —●—.

Die Kulturen wurden im folgenden in Umwurf-Reaktoren bei 1000 Upm und 0,5 vvm geführt. Die Verwendung von $MgHPO_4$ als Zusatz zur Nährlösung (siehe III.A.2.1.) machte in besonderen Fällen den Einsatz eines Turbinen-Rührreaktors mit einer von oben in den Innenraum eingeführten Rührwelle (Biostat S) erforderlich, um eine Beschädigung der Gleitringdichtungen durch die unlöslichen Zusatzstoffe zu vermeiden.

2. Optimierung der Nährlösung

Komplexe Substrate bieten generell gute Voraussetzungen zur Produktion sekundärer Metabolite hinsichtlich ihres Nährstoffgehaltes und der Verfügbarkeit der einzelnen Bestandteile, wenn deren Zusammensetzung auch nicht immer genau bekannt ist und in einzelnen Chargen schwankt. So war beispielsweise die Nährlösung III.2 für die Produktion der Biotin-Antagonisten aus Tü 2460 und Tü 2605 besonders geeignet. Allerdings war eine Trennung der reinen Wirkstoffe von anderen niedermolekularen Begleitstoffen insbesondere aus dem Fleischextrakt äußerst schwierig, so daß die Entwicklung einer definierten Nährlösung notwendig wurde.

Ausgehend von einer ersten Variation durch Hydrolyse des Fleischextraktes wurde in einem zweiten Schritt durch Einsetzen einer Aminosäurenlösung (Zusammensetzung entsprechend einer Aminosäuren-Analyse des Fleischextraktes) anstelle des Hydrolysates eine erste definierte Nährlösung mit Glukose als Kohlenstoffquelle mit zufriedenstellenden Produktausbeuten erhalten.

Anschließend wurde durch gezielten Einsatz geeigneter Methoden der biometrischen Versuchsplanung (RUTTLOFF et al., 1979) mit entsprechend geringem Aufwand ein definiertes Minimalmedium aus anorganischen Salzen, einer Kohlenstoffquelle und Spurenelementen zusammengestellt.

In einem Feld aus 4 Faktoren (A-D) zu je 3 Stufen (1-3) wurden die folgenden Nährstoffe in 'resting-cell' Kulturen nach der von AUDEN et al. (1967) beschriebenen Methode der griechisch lateinischen Quadrate kombiniert. A (C-Quelle): Glycerin (1), Glukose (2) und Stärke (3); B (organische N-Quelle): Glycin (1), Asparagin (2) und eine definierte Aminosäurenlösung (3); C (anorganische N-Quelle): $(NH_4)_2SO_4$ (1), $NaNO_3$ (2) und NH_4NO_3 (3) sowie D: eine Spurenelementelösung in 3 Konzentrationsstufen (POETSCH, 1982). Die so erhaltene Basis-Nährlösung, bestehend aus (je l) 50 ml Glycerin, 1,74 g K_2HPO_4, 5 g $(NH_4)_2SO_4$ und 1 ml der Spurenelementelösung, wurde im folgenden weiter durch Variation der Einzelkonzentrationen optimiert.

2.1. N-Quellen-Variation und Stickstoff-Regulation

Zusätzlich zu den drei empirisch ausgewählten anorganischen N-Quellen der Basis-Nährlösung wurde in 'resting-cell'-Kulturen der Einfluß weiterer 11 Stickstoffverbindungen sowie der 20 proteinogenen Aminosäuren (nicht einzeln dargestellt) für die Antibiotika-Produktion untersucht. Allein mit di-Ammoniumcitrat wurden dem Ammoniumsulfat vergleichbare Erträge erzielt (Tabelle 4). Die qualitativ gleichen Ergebnisse für Tü 2460 sind nicht dargestellt.

Bei der Verwendung von Ammmonium-Ionen als Stickstoffquelle tritt häufig eine N-Repression ein, die nach ŌMURA et al. (1980) durch den Zusatz von $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8\ H_2O$ aufgehoben werden kann. Die Produktion der Biotin-Antimetabolite in Nährlösung 6 konnte bei Tü 2460 entsprechend durch den Einsatz von $MgHPO_4$ (1%, Zugabe nach 34 Stunden Kulturzeit) und gleichzeitige Erhöhung des Ammoniumsulfat-Gehaltes auf 2% deutlich gesteigert werden (Abb. 8a).

Tabelle 4: Produktion von Acm-Peptiden in 'resting-cell' Kulturen von Tü 2605 in RC-Medium mit verschiedenen Stickstoff-[a] oder Kohlenstoff-[b] Quellen.

N-Quelle[a]	Acm-Peptide mg_{BC} $1/l$	C-Quelle[b]	Acm-Peptide mg_{BC} $1/l$
keine	29	keine	29
$(NH_4)_2SO_4$	401	D-Glukose	415
NH_4Cl	36	D-Galaktose	46
$NaNH_4HPO_4$	69	D-Fruktose	30
$NaNO_3$	108	D-Mannose	46
NH_4NO_3	29	L-Rhamnose	20
NH_4-acetat	-	D-Mannit	20
di-(NH_4)-tartrat	108	m-Inosit	24
di-(NH_4)-citrat	400	Glycerin	517
$(NH_4)_2HPO_4$	69	D-Xylose	3
NH_4HCO_3	45	D-Arabinose	15
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	134	D-Ribose	72
$NH_4FeSO_4 \cdot 6\ H_2O$	167	Trehalose	89
$NH_4Mo_7 \cdot 4\ H_2O$	56	Saccharose	57
Harnstoff	35	Maltose	72
		Cellobiose	57
Aminosäuren	20-50	Lactose	30
		Melibiose	24
		Raffinose	30
		Stärke	72

a) C-Quelle hier Glukose (2 %)

b) N-Quelle hier $(NH_4)_2SO_4$ (1 %)

Abb. 8a)

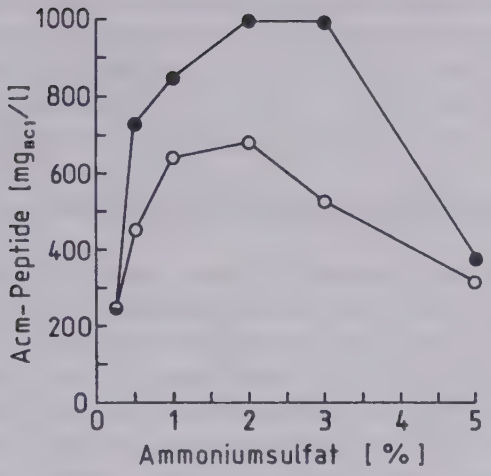


Abb. 8b)

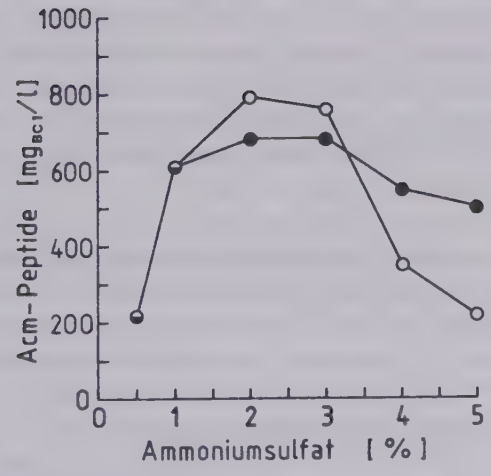


Abb. 8: 'Magnesium-Phosphat-Effekt': Produktion der Acm-Peptide mit Tü 2460 (Abb. 8a) und Tü 2605 (Abb.8b) in NL 6 bei verschiedenen Ammoniumsulfat-Konzentrationen ohne —○— und mit —●— Zusatz von 1% $MgHPO_4 \cdot 3\ H_2O$ nach 34 Stunden in Schüttelkulturen

Bei Tü 2605 wirkten sich Stickstoffregulation und Magnesiumphosphat-Effekt erst bei Ammoniumsulfat-Konzentrationen über 3% aus. Tü 2605 (791 $mg_{BC\ 1}/l$) lieferte zwar höhere Erträge als Tü 2460 (685 $mg_{BC\ 1}/l$) in NL 6 ohne Zusätze, doch konnte die Produktion nicht weiter gesteigert werden (Abb. 8b).

2.2. C-Quellen-Variation und Kohlenstoffrepression

Der Einfluß der Kohlenstoff-Quelle auf die Antibiotika-Produktion wurde unter Erweiterung des Spektrums (siehe Tabellen 2 und 3) in 'resting-cell' Kulturen von Tü 2460 und Tü 2605, die in NL 111.2 angewachsen waren, untersucht. Die höchsten Erträge wurden wiederum bei der Verwendung von Glycerin und Glukose festgestellt (Tabelle 4). Bei einer anschließenden Kombination dieser beiden Substrate und Variation der Mengenverhältnisse wurde ein deutliches Produktionsmaximum bei 2% Glycerin beobachtet (Abb. 9). Ein Zusatz von nur 0,5% Glukose bewirkte zwar einen geringfügigen Rückgang der Erträge, dafür aber eine spürbare Verkürzung der lag-Phase in diesem Minimalmedium. Bei weiterer Erhöhung des C-Quellen-Anteiles über 2% hinaus ging die Produktion langsam wieder zurück.

Durch den Einsatz von Glycerin anstelle von Glukose in Minimalmedien wurde die Produktion der Acm-Peptide auf das Doppelte erhöht, anstelle von Malzextrakt in Komplexmedien sogar auf das 10-fache der Ausgangswerte stimuliert.

2.3. Einfluß von anorganischem Phosphat

Anorganisches Phosphat (P_i) fördert das Wachstum bei Pro- und Eukaryonten in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 300 mM, während die Produktion vieler Sekundärmetabolite bereits bei etwa 10 mM P_i unterdrückt wird (WEINBERG, 1974; MARTIN, 1977).

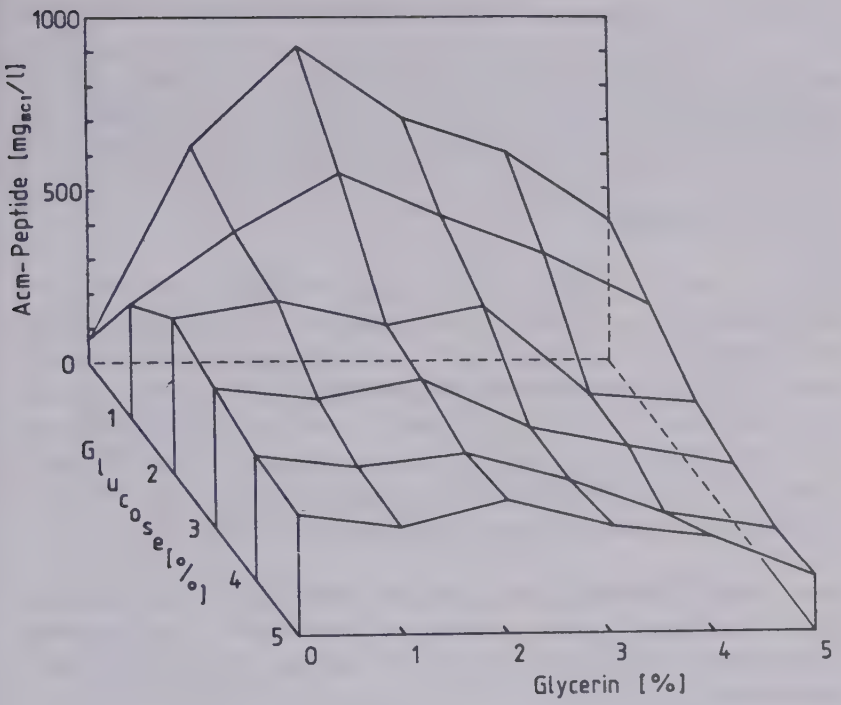


Abb. 9: Produktion der Acm-Peptide bei Variation des Glukose/Glycerin-Verhältnisses in NL 6 in 'resting-cell' Kulturen mit Tü 2605.

Bei einer Variation der Phosphat-Konzentration zwischen 0,3 und 100 mM in Kulturen von Tü 2460 und Tü 2605 in Schüttelkolben wurde erst bei 20 mM ein leichter Rückgang der Antibiotika-Produktion beobachtet und noch bei 100 mM P_i biologische Aktivität im Kulturfiltrat nachgewiesen.

Obwohl die Produktion der Wirkstoffe erst kurz vor Erschöpfung des Phosphatgehaltes im Medium einsetzte, verlief die Synthese der Sekundärmetabolite in Korrelation zum Wachstum,

so daß kein ausgeprägter Tropho-Idiophasenwechsel (BU'LOCK et al., 1975) beobachtet werden konnte; in der stationären Phase war sogar durch Zusatz von P_i in Form von konzentrierter Nährlösung durch pO_2-gesteuertes feeding (Ergebnisse nicht dargestellt) nochmals eine geringe Steigerung möglich.

2.4. Spurenelemente

Fe^{3+} und Zn^{2+} sind für das Wachstum von Streptomyceten und für sekundäre mikrobielle Prozesse von großer Bedeutung (WEINBERG, 1982). Neben Mg^{2+} waren diese Spurenelemente bereits wichtige Bestandteile der Basisnährlösung. Durch Zusätze von Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+} oder Mo^{6+}, die seltener kritische Faktoren für Sekundärstoffwechsel und Differenzierung darstellen (WEINBERG, 1982), wurde keine weitere Steigerung der Antibiotika-Produktion erreicht.

Nach diesem Optimierungsverfahren stand ein Minimalmedium (NL 6) zur Verfügung , das unter den vorher ermittelten günstigsten Betriebsbedingungen den anfangs gestellten Anforderungen gerecht wurde und folgende entscheidende Vorteile aufzeigte:

Erträge: Bei vergleichbar hohen Antibiotika-Ausbeuten konnte für die Herstellung von genügend Rohmaterial für die Strukturanalyse und weiterführende biologische Untersuchungen die komplexe Nährlösung NL 111.2 durch das definierte Medium ersetzt werden.

Reinheit: Die Reduzierung der störenden Begleitstoffe im Substrat ermöglichte die Isolierung der Wirkstoffe in reiner Form. Der Einfluß von Regulationsmechanismen konnte in 'resting-cell' Kulturen untersucht und die Zusammensetzung des Mediums auf eine Umgehung dieser Mechanismen abgestimmt werden.

3. Batch-Fermentation im Labormaßstab

Die Optimierung der Fermentationsführung erfolgte in Schüttelkulturen und verschiedenen Rührkesseln (siehe Tab. 2). Der Verlauf einer Kultur in einem Umwurfreaktor (Typ b 25) mit 25 l Arbeitsvolumen ist in Abb. 10 am Beispiel von Tü 2460 dargestellt (zum Vergleich mit Tü 2605 siehe Abb. 7c).

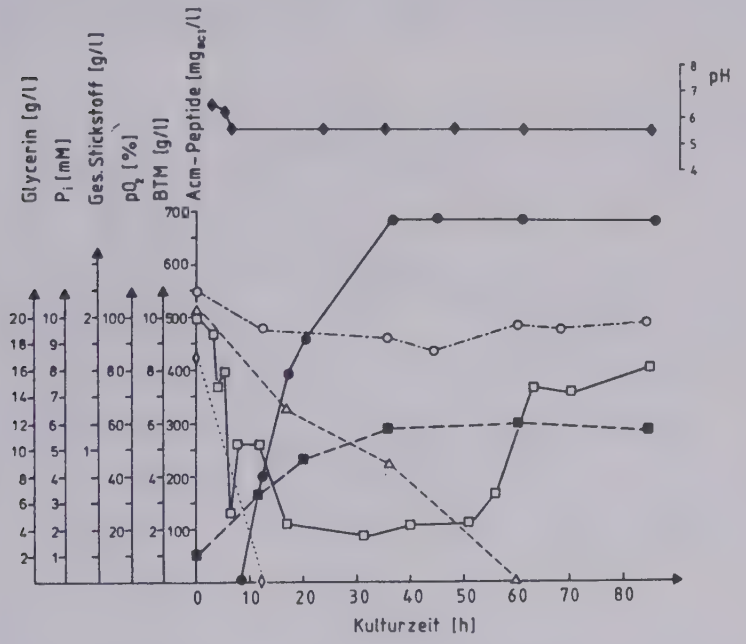


Abb. 10: Batch-Fermentation von Tü 2460 in NL 6 im Umwurf-Reaktor (b 25) bei 0,5 vvm, 1000 Upm und 30 °C.
—□— pO_2; ---■--- BTM; ·····◇····· P_i; —●— Acm-Peptide; -·-○-·- Ges.Stickstoff; —◆— pH; --△-- Glycerin.

Die beiden Produktionsstämme waren bei der pH-Regelung sehr empfindlich gegen zu schnelles Zudosieren insbesondere von H_2SO_4, während in Kulturen ohne Steuerung beim langsamen

Absinken des pH-Wertes bis auf 3 keine Beeinträchtigung der Vitalität und Produktion beobachtet wurde. Deshalb wurde das Nährmedium im Reaktor vor dem Impfen auf den pH-Wert der entsprechenden Vorkultur eingestellt (meistens etwa 6,5) und die Fermentation zunächst ohne pH-Regelung geführt. Nach dem langsamen Absinken bis auf pH 5,5 wurde dann dieser Sollwert durch automatische Regelung konstant gehalten. Günstiger Nebeneffekt und Vorteil bei der Reinigung der Wirkstoffe war die bei diesem niedrigen pH-Wert reduzierte Melaninbildung.

Die Sauerstoffsättigung des Mediums geriet bei Einhaltung der oben angegebenen Betriebsparameter im Kulturverlauf nicht in limitierende Bereiche und diente als Indikator für den jeweiligen metabolischen Zustand der Zellen. Die Umstellung auf Glycerin als C-Quelle nach Verbrauch der Glukose äußerte sich z.B. durch einen kurzfristigen Anstieg der O_2-Sättigungskurve und erneute starke Sauerstoffzehrung in der logarithmischen Phase (ein kleiner Vorpeak wurde möglicherweise durch den Beginn der automatischen pH-Regelung hervorgerufen). Bei hoher Atmungsaktivität blieb die Sauerstoffsättigung in der stationären Phase auf relativ niedrigem Niveau bis die C-Quelle vollends erschöpft war. In der Absterbephase führte kryptisches Wachstum nochmals zu einer geringfügigen Sauerstoffzehrung.

Die Antibiotikaproduktion setzte etwa gleichzeitig mit der weitgehenden Aufnahme der Phosphationen aus dem Medium ein und zeigte wachstumskorrelierten Verlauf. Eine deutliche Trennung zwischen Tropho- und Idiophase wurde nicht beobachtet, ist aber auf dem Niveau einzelner Zellen im Zellzyklus möglicherweise realisiert. Entsprechend wurde das Produktionsmaximum (685 mg_{BC} l/l) bei Eintritt in die stationäre Phase ereicht. Tü 2605 zeigte eine deutlich längere lag-Phase in NL 6, erreichte aber im Fermentationsverlauf eine höhere Biomasse; bei vergleichbarem Mycelgewicht wurden mit Tü 2605 relativ höhere Erträge erzielt.

Zur weiteren Charakterisierung des Kulturverlaufs in NL 6 wurde eine Abluftanalyse mit Tü 2605 im 10 l Blattrührfermenter (Biostat E) durchgeführt. Der Verlauf dieser Fermentation ist in Abb. 11 dargestellt und durch die in Tabelle 5 und den Abbildungen 12 und 13 aufgeführten Parameter charakterisiert. Das exponentielle Wachstum wurde in diesem System gegen Ende der logarithmischen Phase durch unzureichenden Sauerstoffeintrag limitiert, wobei die Drehzahl der Turbine nicht ohne Zerschlagen des Mycels weiter erhöht werden konnte.

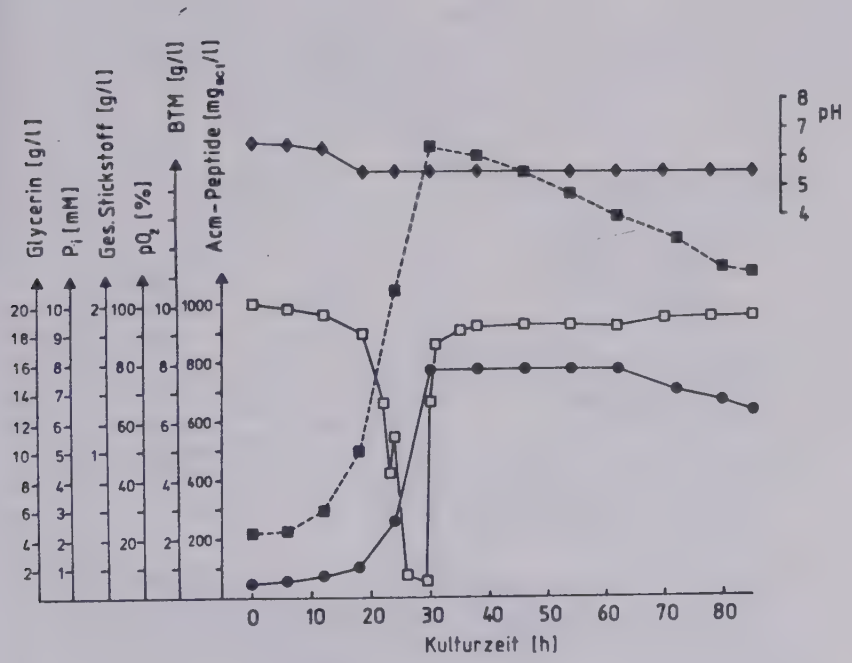


Abb. 11: Verlauf einer batch-Fermentation im 10 l- Blattrührfermenter (Biostat E) mit Tü 2605 in NL 6 bei 1,0 vvm, 750 Upm und 30 °C. --■-- BTM; —□— pO_2; —◆— pH; —●— Acm-Peptide.

Tabelle 5: Wachstumsparameter von Tü 2605 in NL 6 in der logarithmischen Phase (Biostat E; 1,0 vvm; 750 Upm; 30 °C).

μ	:	0,82	$[h^{-1}]$
QO_2	:	2,09	[g/l·h]
QCO_2	:	1,77	[g/l·h]
q_{O2}	:	0,27	[g/l·h]
q_{CO2}	:	0,23	[g/l·h]
c_{O2}	:	$6{,}53 \cdot 10^{-3}$	[g/l]
$K_L \cdot a$	:	434	$[h^{-1}]$

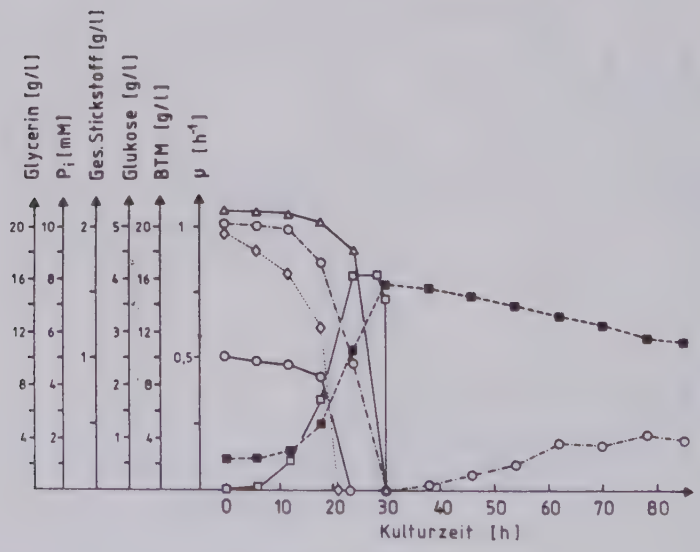


Abb. 12: Wachstum von TÜ 2605 im 10 l-Blattrührfermenter (Biostat E) und Substratverbrauch in NL 6 bei 1,0 vvm, 750 Upm und 30 °C. —△— Glycerin, ·····◇····· P_i, ---○--- Ges.Stickstoff, —■— BTM, —□— μ.

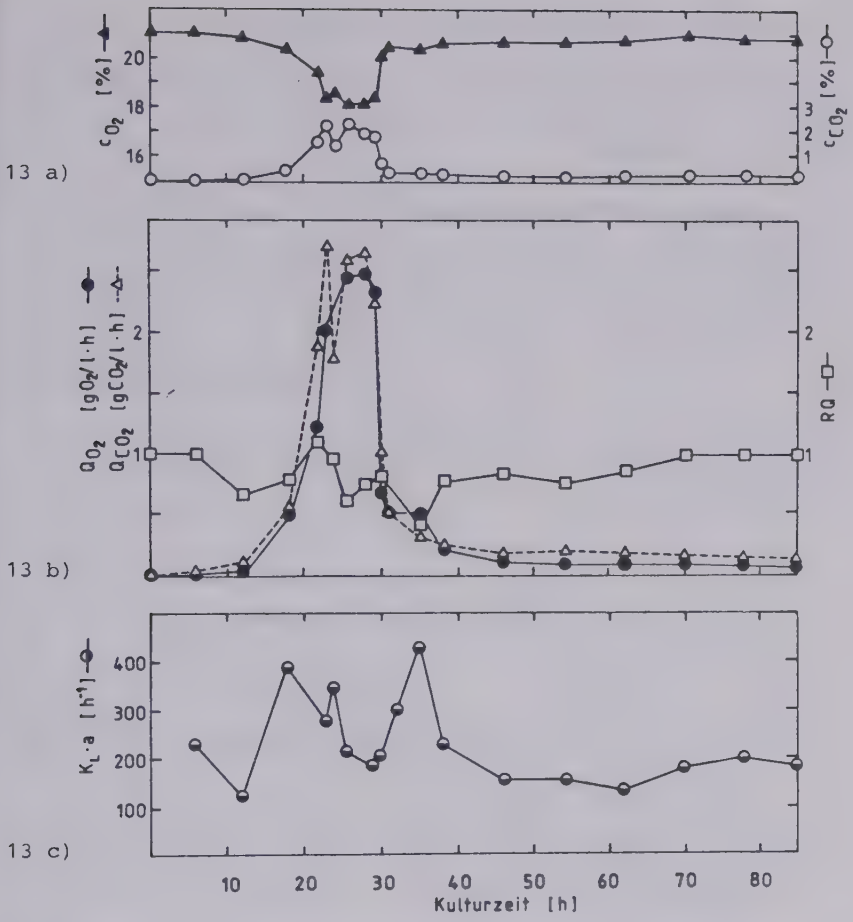


Abb. 13: Wachstumsparameter von Tü 2605 im 10 l-Blattrührfermenter bei 1,0 vvm, 750 Upm und 30 °C:

a) Volumenkonzentrationen des nicht veratmeten Rest sauerstoffs (c_{O2}) und des gebildeten Kohlendioxids (c_{CO2}) in der Fermenterabluft.

b) Absolute O_2-Aufnahmerate (Q_{O2}), absolute CO_2-Bildungsrate (Q_{CO2}) und respiratorischer Quotient (RQ).

c) Volumetrischer Sauerstoffübergangskoeffizient $K_L \cdot a$.

4. Batch-Fermentation im technischen Maßstab

Zur Herstellung größerer Produktmengen wurde das verbesserte Verfahren zur Herstellung der Acm-Peptide in den technischen Maßstab übertragen.

Die Anpassung der Betriebsbedingungen beim Übergang von Schüttelkulturen auf Rührkessel im Maßstab von 3, 10 und 25 l Arbeitsvolumen ist oben beschrieben (III.B.2.). Bei der Fortführung dieses 'scaling up' konnten diese Betriebsparameter ohne Ertragseinbußen auf die nächst höhere Stufe (200 l) übertragen werden (Abb. 14), jedoch mußte auf den Einsatz von $MgHPO_4$ in dem entsprechenden Umwurf-Reaktor verzichtet werden, um mechanische Beschädigungen des Rührwerkes (s.o.) zu vermeiden.

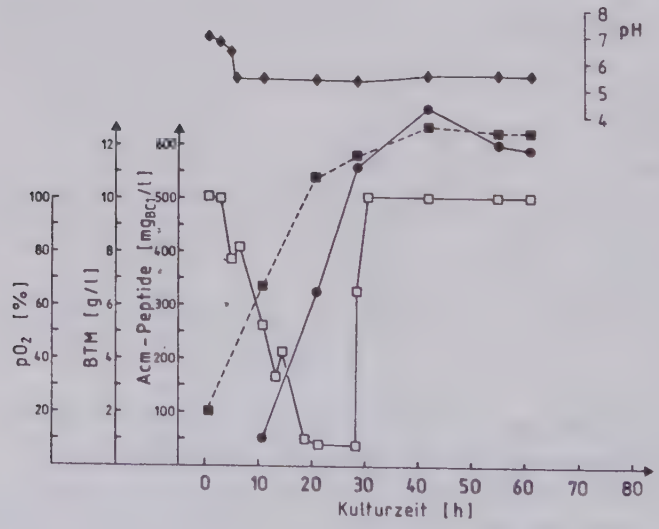


Abb. 14: Produktion der Acm-Peptide mit Tü 2460 im Umwurf-Reaktor (b 200) in NL 6 bei 0,5 vvm, 1000 Upm und 30 °C. --■-- BTM; —◆— pH; —□— pO_2; —●— Acm-Peptide.

Das Impfgut, in diesem Fall 10% des Kulturvolumens, wurde entsprechend den unter II.5.5.1. beschriebenen Bedingungen in einem 20 l Umwurffermenter (Typ b 20) angezogen. Die pH-Regulierung erforderte eine sehr fein abgestimmte Dosierung, da bei diesem Kulturvolumen recht große Mengen Säure und Lauge impulsweise in den Reaktor gegeben werden mußten, was lokal begrenzt zu kurzfristigen pH-Schwankungen führen dürfte. Nach 65 Stunden wurde die Fermentation abgebrochen und das Kulturfiltrat durch Abpressen des Mycels gewonnen.

5. Isolierung der Wirkstoffe

Die Reinigung des Wirkstoffgemisches aus dem Filtrat von Kulturen im Minimalmedium NL 6 erfolgte durch Adsorptionschromatographie an Amberlite XAD 4 (Waschen mit Wasser, Eluieren mit 50% Aceton), Verteilungschromatographie nach CRAIG (1943) (0,2 N Ammoniak / 1-Butanol; 440 Stufen à 10 ml) und anschließende präparative HPLC (KERN, 1983; siehe Abb. 15). Im letzten Schritt wurden sechs chromatographisch reine, biologisch aktive Substanzen getrennt, die im folgenden als BC 1 - 6 bezeichnet werden. Von KERN (1983) wurde nach wiederholten HPLC-Trennungen die Strukturanalyse dieser Wirkstoffe durchgeführt und ein präparativer Reinigungsgang für die Isolierung größerer Mengen der reinen Verbindungen aus mehreren 200 l-Kulturen (siehe III.B.4.) für weiterführende chemische und biologische Untersuchungen entwickelt.

Präparative und analytische HPLC ermöglichten jedoch nicht die quantitative Bestimmung der Wirkstoffe direkt im Kulturfiltrat ohne vorherige aufwendige Reinigungsschritte. Deshalb wurde die biologische Aktivität der Kulturproben im Plattendiffusionstest (II.7.2.) gemessen und das Verhältnis der Einzelkomponenten, die sich mit dieser Methode nicht unterscheiden ließen, aus dem Anteil der reinen Wirkstoffe an der Gesamtmenge der präparativ isolierten Antibiotika bestimmt (Tabelle 6).

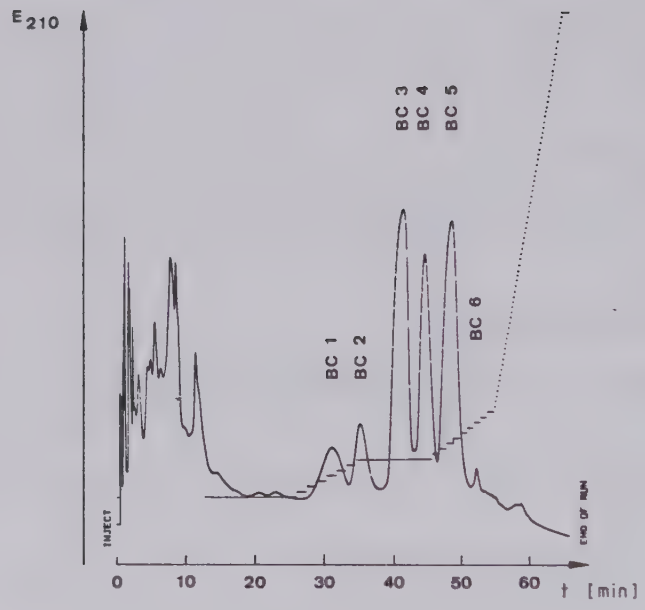


Abb. 15: Präparative HPLC-Trennung der Acm-Peptide BC 1 - 6

Säule: Lichrosorb NH_2

Mobile Phase: A: 0,01 M KH_2PO_4

B: Acetonitril/Wasser (50:1)

Gradient:

Zeit (min)	% A	%B
0	8	92
25	8	92
35	15	85
45	15	85
55	25	75
65	100	0
70	100	0

Fließgeschwindigkeit: 1,5 ml/h

Tabelle 6: Verhältnis der Einzelkomponenten in der Gesamtmenge der isolierten Acm-Peptide.

Acm-Peptide		Ertrag % (w/w)
BC 1	(MeIle-Acm)	24
BC 2	(Ile-Acm)	3
BC 3	(MeVal-Acm)	1
BC 4	(MeIle-Acm-Gln)	24
BC 5	(Ile-Acm-Gln)	47
BC 6	(Val-Acm-Gln)	1

In Abb. 16 ist das Ergebnis der durch Variation der Betriebsbedingungen und Entwicklung einer definierten Nährlösung erzielten Fermentationsoptimierung zur Herstellung der Acm-Peptide mit Tü 2460 und Tü 2605 in einer Übersicht dargestellt.

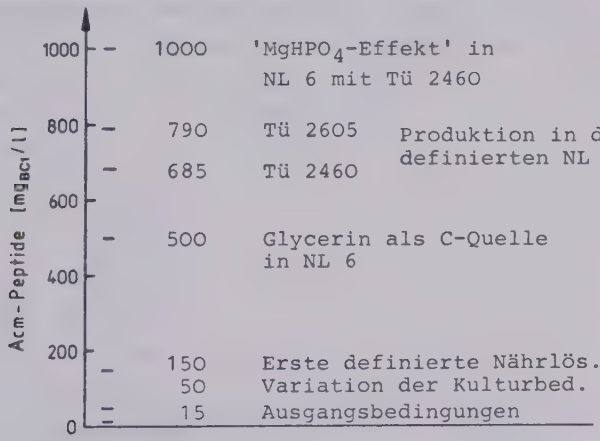


Abb. 16: Ertragsteigerung im Lauf der Fermentationsoptimierung

6. Chemisch-physikalische Charakterisierung der Wirkstoffe

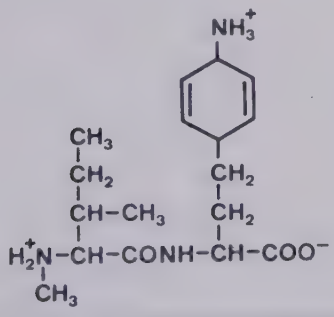
Aus dem Kulturfiltrat der Streptomyceten Tü 2460 und Tü 2605 wurden sechs Biotin-Antimetaboliten isoliert, deren chemisch-physikalische Eigenschaften* in den Tabellen 8 - 13 (a) Löslichkeit: s: sehr leicht; l: leicht; n: nicht; b) Laufmittel siehe II.6.9) zusammengefaßt sind.

Neben den Acm-Peptiden wurde aus diesen beiden Stämmen ein Polypeptid (BC L) aus dem Kulturfiltrat isoliert, das nach Abtrennung der niedermolekularen Wirkstoffe keine biologische Aktivität zeigte. BC L unterscheidet sich aber in der Aminosäuren-Zusammensetzung, Löslichkeit und seinem Verhalten in der Dialyse von dem ebenfalls aus Streptomyceten isolierten Streptavidin, so daß die Identität dieser Verbindungen ausgeschlossen wurde (KERN, 1983). In Kombination z. B. mit BC 6 wurde eine schwache synergistische Verstärkung der antibakteriellen Aktivität festgestellt (WERNER, persönliche Mitteilung, 1983).

* (Nach wiederholten Untersuchungen der chemischen Struktur enthalten die Tripeptide BC 4-6 Glutamin anstelle von Glutaminsäure; KERN, persönliche Mitteilung, 1984).

Tabelle 7: Chemisch-physikalische Eigenschaften von BC 1

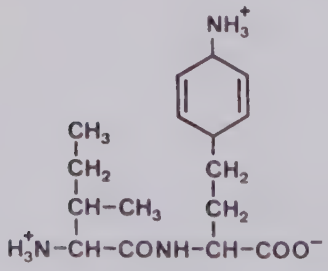
Name	:	L-Methylisoleucyl-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)butansäure (MeIle-Acm)
Synonyme	:	BC 1; MSD-235 S 3, Stravidin
Produzenten	:	Streptomyces venezuelae Tü 2460 Streptomyces lavendulae Tü 2605
Biol. Aktivität	:	Biotin-Antimetabolit
Testkeim	:	Escherichia coli 12593/74
Chemische Natur	:	Dipeptid
Formel	:	$C_{17}H_{29}N_3O_3$
Molekulargewicht	:	323
Physikal. Natur	:	weißes Pulver
Schmelzpunkt	:	> 200 °C
Löslichkeit [a]	:	s: H_2O; l: MeOH ; n: Aceton, Diethylether, Essigester, Hexan und Petrolether
Qual. chem. Reakt.	:	Ninhydrin positiv Chlor/TDM positiv
Dünnschichtchromat.	:	R_f 0,29 [b]
Stabilität	:	pH 1.0 - 9,0; 60 °C, 5 h
LD_{50} (Maus)	:	> 320 mg/kg (i.p.)
UV-Absorption	:	Endabsorption
IR-Spektrum (KBr)	:	siehe Abb.17



MeIle-Acm

Tabelle 8: Chemisch-physikalische Eigenschaften von BC 2

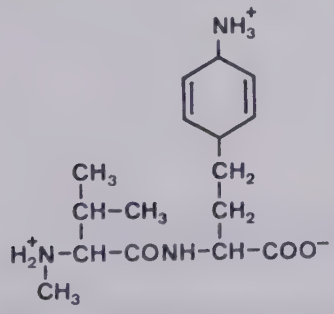
Name	:	L-Isoleucyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)butansäure (Ile-Acm)
Synonyme	:	BC 2
Produzenten	:	Streptomyces venezuelae Tü 2460 Streptomyces lavendulae Tü 2605
Biol. Aktivität	:	Biotin-Antagonist
Testkeim	:	Escherichia coli 12593/74
Chemische Natur	:	Dipeptid
Formel	:	$C_{16}H_{27}N_3O_3$
Molekulargewicht	:	309
Physikal. Natur	:	weißes Pulver
Schmelzpunkt	:	110 °C
Löslichkeit [a]	:	s: H_2O; l: MeOH ; n: Aceton, Diethylether, Essigester, Hexan und Petrolether
Qual. chem. Reakt.	:	Ninhydrin positiv Chlor/TDM positiv
Dünnschichtchromat.	:	R_f 0,23 [b]
Stabilität	:	pH 1.0 - 9,0; 60 °C, 5 h
LD_{50} (Maus)	:	> 320 mg/kg (i.p.)
UV-Absorption	:	Endabsorption
IR-Spektrum (KBr)	:	siehe Abb. 17



Ile-Acm

Tabelle 9: Chemisch-physikalische Eigenschaften von BC 3

Name	:	L-Methylvalyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)butansäure (MeVal-Acm)
Synonyme	:	BC 3; MSD-235 S 2
Produzenten	:	Streptomyces venezuelae Tü 2460 Streptomyces lavendulae Tü 2605
Biol. Aktivität	:	Biotin-Antimetabolit
Testkeim	:	Escherichia coli 12593/74
Chemische Natur	:	Dipeptid
Formel	:	$C_{16}H_{27}N_3O_3$
Molekulargewicht	:	309
Physikal. Natur	:	weißes Pulver
Schmelzpunkt	:	118 °C
Löslichkeit [a]	:	s: H_2O; l: MeOH ; n: Aceton, Diethylether, Essigester, Hexan und Petrolether
Qual. chem. Reakt.	:	Ninhydrin positiv Chlor/TDM positiv
Dünnschichtchromat.	:	R_f 0,20[b]
Stabilität	:	pH 1.0 - 9,0; 60 °C, 5 h
LD_{50} (Maus)	:	> 320 mg/kg (i.p.)
UV-Absorption	:	Endabsorption
IR-Spektrum (KBr)	:	siehe Abb. 17



MeVal-Acm

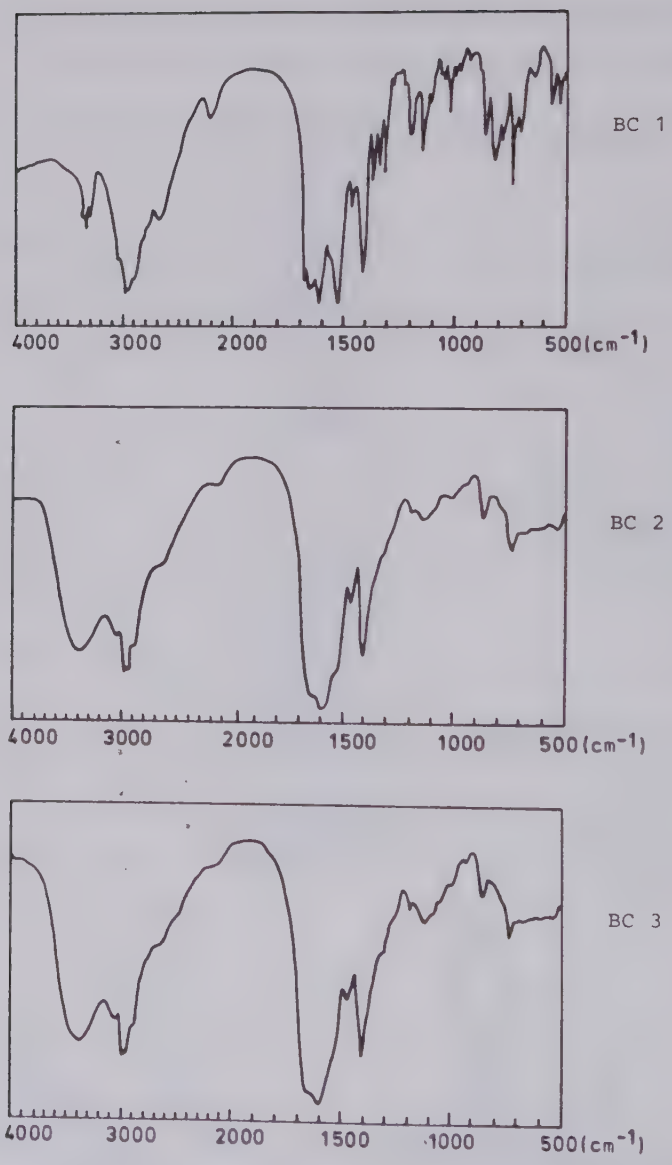


Abb. 17: IR-Spektren der Dipeptide BC 1-3 (KBr-Methode)

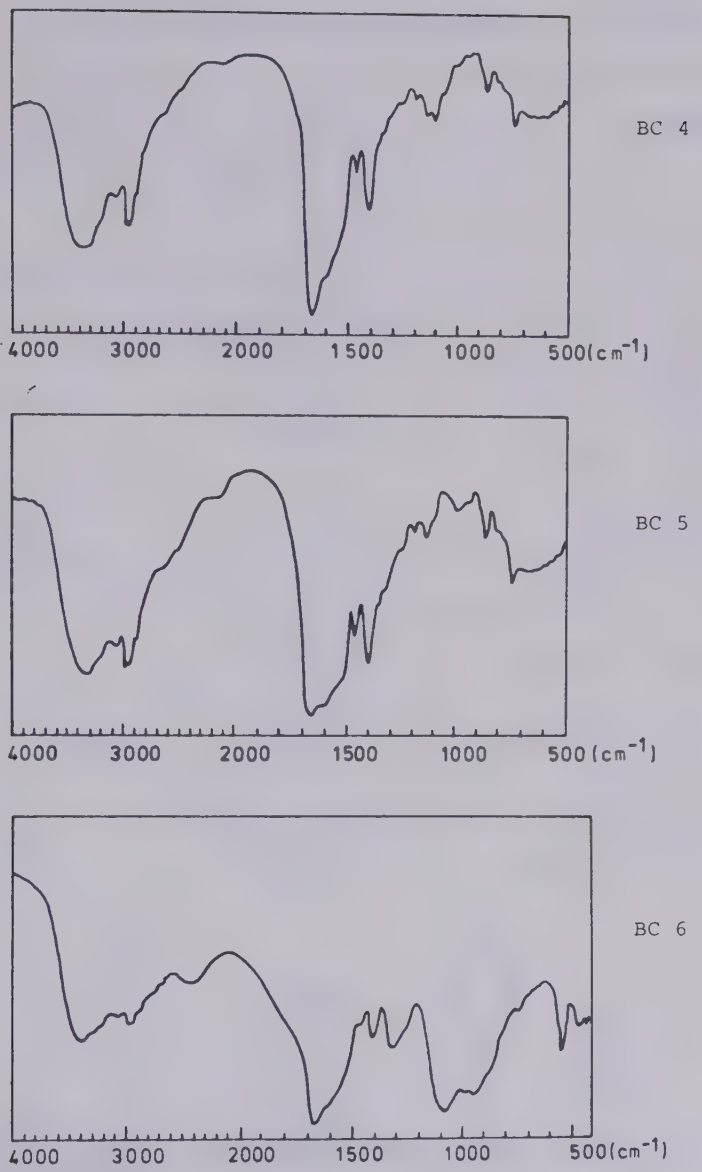
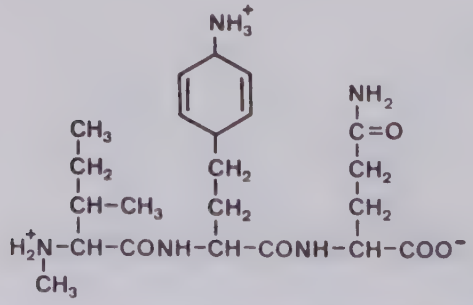


Abb. 18: IR-Spektren der Tripeptide BC 4-6 (KBr-Methode)

Tabelle 10: Chemisch-physikalische Eigenschaften von BC 4

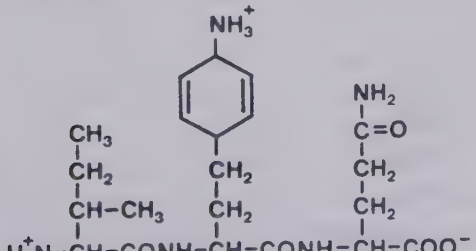
Name	:	L-Methylisoleucyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)-butanoyl-L-glutamin (MeIle-Acm-Gln)
Synonyme	:	BC 4
Produzenten	:	Streptomyces venezuelae Tü 2460 Streptomyces lavendulae Tü 2605
Biol. Aktivität	:	Biotin-Antimetabolit
Testkeim	:	Escherichia coli 12593/74
Chemische Natur	:	Tripeptid
Formel	:	$C_{22}H_{36}N_4O_6$
Molekulargewicht	:	451
Physikal. Natur	:	weißes Pulver
Schmelzpunkt	:	120 °C
Löslichkeit [a]	:	s: H_2O; l: MeOH ; n: Aceton, Diethylether, Essigester, Hexan und Petrolether
Qual. chem. Reakt.	:	Ninhydrin positiv Chlor/TDM positiv
Dünnschichtchromat.	:	R_f 0,16 [b]
Stabilität	:	pH 1.0 - 9,0; 60 °C, 5 h
LD_{50} (Maus)	:	> 320 mg/kg (i.p.)
UV-Absorption	:	Endabsorption
IR-Spektrum (KBr)	:	siehe Abb. 18



MeIle-Acm-Gln

Tabelle 11: Chemisch-physikalische Eigenschaften von BC 5

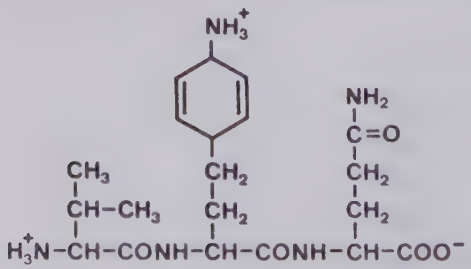
Name	:	L-Isoleucyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)-butanoyl-L-glutamin (Ile-Acm-Gln)
Synonyme	:	BC 5
Produzenten	:	Streptomyces venezuelae Tü 2460 Streptomyces lavendulae Tü 2605
Biol. Aktivität	:	Biotin-Antimetabolit
Testkeim	:	Escherichia coli 12593/74
Chemische Natur	:	Tripeptid
Formel	:	$C_{21}H_{34}N_4O_6$
Molekulargewicht	:	437
Physikal. Natur	:	weißes Pulver
Schmelzpunkt	:	145 °C
Löslichkeit [a]	:	s: H_2O; l: MeOH ; n: Aceton, Diethylether, Essigester, Hexan und Petrolether
Qual. chem. Reakt.	:	Ninhydrin positiv Chlor/TDM positiv
Dünnschichtchromat.	:	R_f 0,13 [b]
Stabilität	:	pH 1.0 - 9,0; 60 °C, 5 h
LD_{50} (Maus)	:	> 320 mg/kg (i.p.)
UV-Absorption	:	Endabsorption
IR-Spektrum (KBr)	:	siehe Abb. 18



Ile-Acm-Gln

Tabelle 12: Chemisch-physikalische Eigenschaften von BC 6

Name	:	L-Valyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexandienyl)-butanoyl-L-glutamin (Val-Acm-Gln)
Synonyme	:	BC 6
Produzenten	:	Streptomyces venezuelae Tü 2460 Streptomyces lavendulae Tü 2605
Biol. Aktivität	:	Biotin-Antimetabolit
Testkeim	:	Escherichia coli 12593/74
Chemische Natur	:	Tripeptid
Formel	:	$C_{20}H_{32}N_4O_6$
Molekulargewicht	:	423
Physikal. Natur	:	weißes Pulver
Schmelzpunkt	:	> 200 °C
Löslichkeit [a]	:	s: H_2O; l: MeOH ; n: Aceton, Diethylether, Essigester, Hexan und Petrolether
Qual. chem. Reakt.	:	Ninhydrin positiv Chlor/TDM positiv
Dünnschichtchromat.	:	R_f 0,10 [b]
Stabilität	:	pH 1.0 - 9,0; 60 °C, 5 h
LD_{50} (Maus)	:	> 320 mg/kg (i.p.)
UV-Absorption	:	Endabsorption
IR-Spektrum (KBr)	:	siehe Abb. 18



Val-Acm-Gln

C. Wirkungsweise

1. Untersuchungen zum Antagonismus

Im ersten Screening zeigten Tü 2460 und Tü 2605 im Differenztest (HANKA, 1960) nur auf Minimalmedien wachstumshemmende Wirkung auf gram-negative Bakterien. Zur Identifizierung derjenigen Substanz(en), die auf komplexen Nährböden diese Wirkung als natürliche Inhaltstoffe der Medien aufheben können, wurden in Kreuztests mit Escherichia coli 12593/74 auf BFA deshalb Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Vitamine auf eine antagonistische Wirkung geprüft und dabei die Aufhebung der antibakteriellen Aktivität durch Biotin festgestellt.

Aus der Literatur waren Amiclenomycin (OKAMI et al., 1974) und die Peptide Stravidin und MSD-235 S2 (STAPLEY et al., 1963) als Biotinantagonisten bekannt, deren essentielle Teilstruktur ebenfalls Acm ist. Wirkort und -mechanismus von Amiclenomycin (KITAHARA et al., 1974) sind beschrieben, jedoch ist das Wirkspektrum nach OKAMI et al. (1974) eng auf einige Vertreter der Familie Mycobacteriaceae begrenzt.

In Biophotometerversuchen (nicht dargestellt) und weiteren Kreuztests auf den gleichen Testplatten wurde der Einfluß der Biotin-Vorstufen 7-Keto-8-amino-Pelargonsäure (KAPA), 7,8-Diaminopelargonsäure (DAPA) und Desthiobiotin (DTB) auf die antibakterielle Aktivität der Acm-Peptide BC 1 - 6 im Vergleich zu dem Acm-Warhead und Actithiazic acid (KAWASHIMA et al., 1956), welches ebenfalls die Biotin-Synthese hemmt, jedoch auf einer späteren Stufe, untersucht. Im gleichen Versuch wurden Pimelinsäure, Glutarsäure, L-Alanin und S-Adenosylmethionin, die ebenfalls an der Biotinsynthese beteiligt sind (OGATA et al., 1972; IZUMI et al., 1973; EISENBERG und STONER, 1971), auf antagonistische Effekte geprüft. Die wachstumshemmende Wirkung der Acm-Peptide wurde

Tabelle 13: Antagonistische Wirkung von Metaboliten der Biotin-Biosynthese gegen die wachstumshemmende Wirkung der Acm-Peptide, Amiclenomycin und Actithiazic acid im Plattendiffusionstest mit Escherichia coli 12493/74 auf BFA-Agar.

Metabolit	Konz. (µg/ml)	Acm-peptide (10 µg/ml)	Acm* (50 µg/ml)	Actithiazic acid* (50 µg/ml)
——	0	+	+	+
Biotin	0.1	+	+	+
DTB	1.0	+	+	-
DAPA	10	+	+	-
KAPA	1000	-	-	-
Pimelinsäure	1000	-	-	-
Glutarsäure	1000	-	-	-
L-Alanin	1000	-	-	-
SAM	1000	-	-	-

-: kein Wachstum +: Wachstum nach 2 Tagen Inkubation

*: Testorganismus: Mycobacterium smegmatis ATCC 607 (KITAHARA et al., 1974).

durch Biotin, DTB und DAPA antagonisiert, nicht aber durch KAPA oder irgendeine andere der genannten Vorstufen (Tabelle 13). Der für den Acm-Warhead beschriebene Wirkmechanismus (KITAHARA et al., 1974; HOTTA et al., 1975), die Hemmung der Biotinbiosynthese durch Bindung an die KAPA-DAPA-Transaminase (Abb. 19), wurde damit auch für die hier isolierten neuen Biotin-Antimetaboliten nachgewiesen.

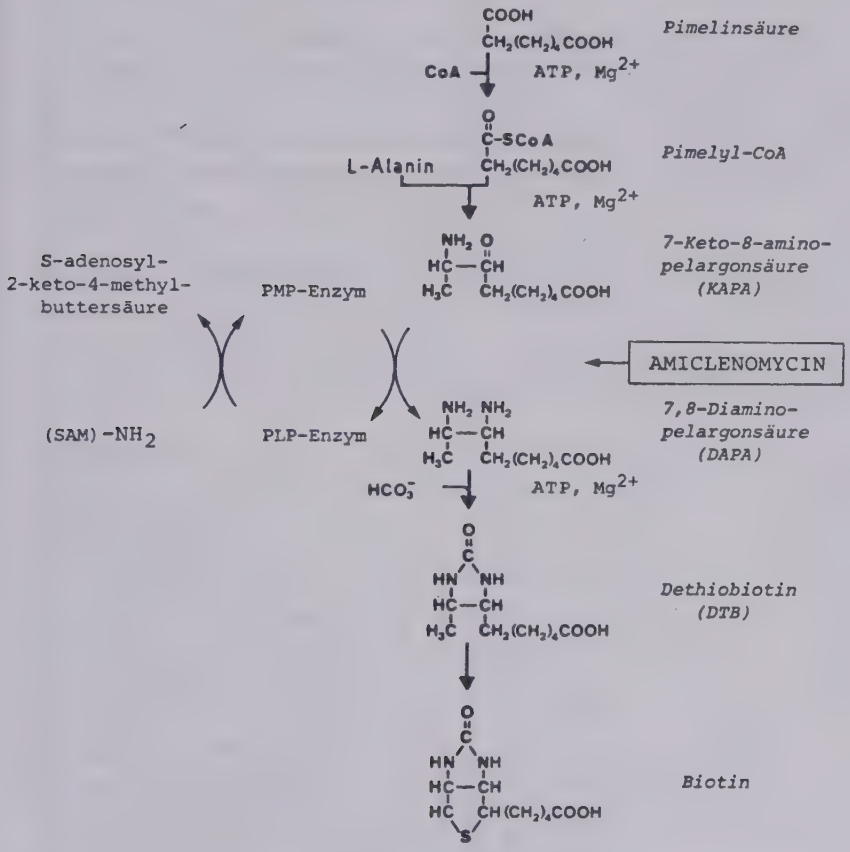


Abb. 19: Biotinbiosynthese bei Mikroorganismen und Mechanismus der DAPA-Aminotransferase-Reaktion nach STONER & EISENBERG (1975).

Tabelle 14: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) der Acm-Peptide gegen gramnegative Bakterien im Reihenverdünnungstest.

Organismen	MHK (µg/ml)					
	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6
Escherichia coli ATTC 11775 TEM	0.125	0.03	0.06	0.06	0.5	0.01
Escherichia coli 11775	0.25	0.007	0.125	0.06	0.125	0.01
Escherichia coli BC 29 beta	0.125	0.03	0.03	0.06	0.25	0.08
Pseudomonas aeruginosa BC 19	>64	>64	>64	64	16	10.5
Pseudomonas aeruginosa Hbg	>64	>64	>64	>64	>64	21.0
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	0.06	0.007	0.06	0.25	0.125	0.16
Klebsiella pneumoniae 1082	8	0.5	1	0.5	0.5	0.33
Klebsiella pneumoniae BC 6	8	16	1	2	0.5	2.62
Serratia marcescens ATCC 13880	4	1	0.5	0.5	2	1.3
Serratia marcescens BC 8	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.04
Enterobacter cloacae ATCC 13047	4	4	8	4	2	1.3
Enterobacter cloacae P 99	0.015	0.03	0.125	0.06	0.125	0.16
Citrobacter freundii ATCC 11601	0.015	0.015	0.015	0.125	0.06	0.04
Proteus inconstans ATCC 25825	0.25	0.007	0.06	0.125	1	0.16
Acinetob. calcoaceticus ATCC 11959	64	>64	64	32	16	10.5
Acinetob. calcoaceticus ATCC 15473	64	>64	64	32	32	21.0

2. Wirkprofil der Acm-Peptide

Das Wirkspektrum der Acm-Peptide wurde in biotinfreiem Minimalmedium (BFA) aufgenommen und die minimalen Hemmkonzentrationen im Verdünnungsreihentest (siehe II. 9.) bestimmt.

2.1. Antibakterielle Aktivität

Die Acm-Peptide hemmten das Wachstum zahlreicher klinisch relevanter, gram-negativer Bakterien (Tabelle 14) mit minimalen Hemmkonzentrationen teilweise im Nanogramm-Bereich, Pseudomonáden dagegen nur sehr schwach, und waren inaktiv gegen die meisten gram-positiven Keime einschließlich Actinomyceten (Tabelle 15).

Tabelle 15: Empfindlichkeit (+) gram-positiver Bakterien und Actinomyceten gegen die Acm-Peptide im Plattendiffusionstest.

Organismen	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6
Bacillus subtilis ATCC 6051	+	+	+	+	+	+
Micrococcus luteus	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium smegmatis ATCC 607	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus aureus SG 511	-	-	-	-	-	-
S. aureus E 88	-	-	-	-	-	-
Streptococcus pyogenes	-	-	-	-	-	-
Streptomyces viridochromogenes Tü 57	-	-	-	-	-	-
S. lavendulae Tü 2605	-	-	-	-	-	-
S. venezuelae Tü 2460	-	-	-	-	-	-

Tabelle 16: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) der Acm-Peptide (100 µg/ml) gegen Pilze im Plattendiffusionstest auf CD-Agar. Methoden (M): V, S, R siehe Text.

Organismen	M	MHK (µg/ml) der Acm-Peptide (BC): 1	2	3	4	5	6
Phytophtora palmivora Tü 666	R	-	-	-	-	-	-
Saprolegnia asterophora CBS 180.44	R	-	-	-	-	-	-
Mucor mucedo Tü 181	S	-	-	-	-	-	-
Mucor miehei Tü 284	S	-	-	-	-	-	-
Alternaria kikuchina Tü 169	R	-	-	-	-	-	-
Aspergillus niger Tü 503	S	-	-	-	-	-	-
Botrytis cinerea Tü 157	R	-	-	-	-	-	-
Candida albicans Tü 164	V	-	-	-	-	-	-
Fusarium solani Tü 8014	S	-	-	-	-	-	-
Hansenula anomala Tü 279	V	-	-	-	-	-	-
Lipomyces lipofer	V	-	-	-	-	-	-
Mycothypha africana Tü 260	S	>64	256	256	64	16	256
Paecilomyces variotii Tü 137	S	-	-	-	-	-	-
Penicillium notatum Tü 136	S	-	-	-	-	-	-
Penicillium puberulum Tü 8006	S	-	-	-	-	-	-
Pichia farinosa Tü 291	V	-	-	-	-	-	-
Pyricularia oryzae Tü 693	R	-	-	-	-	-	-
Rhizoctonia solani Tü 535	R	-	-	-	-	-	-
Rhodotorula rubra Tü 8093	V	-	-	-	-	-	-
Trichophyton mentagrophytes Tü 510	S	512	512	16	128	32	512
Coprinus cinereus Tü 637	S	-	-	-	-	-	-

-: keine Wirkung

2.2. Antifungische Wirkung

Aktivität gegen Pilze wurde im Plattendiffusionstest mit verschiedenen Methoden auf CD-Agar nur bei Trichophyton mentagrophytes und Mycothypha africana, zwei humanpathogenen Ascomyceten gefunden (Tabelle 16). Phytopathogene Pilze wurden weder 'in vivo' auf verschiedenen Wirtspflanzen gehemmt (Tabelle 17), noch konnten diese Infektionen durch Resistenzinduktion in den Wirtspflanzen (SEQUEIRA, 1984) verhindert werden (Tabelle 18) (DRANDAREVSKI, persönliche Mitteilung, 1983). Ich danke Herrn Dr. Drandarevski, Fa. Celamerck, für die Durchführung dieser Versuche.

Tabelle 17: Antifungische Wirkung von BC 1 (MeIle-Acm) 'in vivo' (Noten 1 - 3) nach kombinierter (Wurzel + Blatt) Behandlung (200 + 400 ppm).

Test Parasit / Wirtspflanze	Bonitierungsnoten bei Infektion 1/2	3/4
	Tage nach der Behandlung	
Phytophtora / Tomaten	2	3
Erysiphe / Gurke	3	3
Erysiphe / Gerste	2	2
Erysiphe / Weizen	2	3
Puccinia / Hafer	3	2*
Uromyces / Phaseolus-Bohnen	3	3
Botrytis / Vicia-Bohnen	2	3
Helminthosporium / Gerste	3	3

*) geringe Phytotoxizität

Tabelle 18: Antifungische Wirkung von BC 1 (MeIle-Acm) 'in vivo' (Noten 1 - 3) nach Blattbehandlung (400 ppm) unter besonderer Berücksichtigung der Resistenzinduktion.

Test Parasit / Wirtspflanze	Bonitierungsnoten bei Infektion 2 Tage nach der Behandlung	3	5
Phytophtora / Tomaten	3	3	3
Plasmopara / Reben	2	3	3
Erysiphe / Gurke	3	3	-
Erysiphe / Gerste	2	2	-
Erysiphe / Weizen	3	3	-
Puccinia / Hafer	3	3	3
Uromyces / Phaseolus-Bohnen	3	3	-
Botrytis / Vicia-Bohnen	3	3	-
Helminthosporium / Gerste	3	3	3

2.3. Wirkung gegen Protozoen

Für die Suche nach wirksamen Substanzen gegen Protozoen wurde von TEJMAR-KOLAR und ZÄHNER (1984) ein neues Screeningmodell entwickelt. Damit kann einerseits die Toxizität der Testsubstanzen gegen den Archanneliden Dinophilus gyrociliatus and andererseits die Wirkung auf Protozoen (Eucoccidium dinophili) untersucht werden. Eine Infektion dieses Urringelwurmes durch Eucoccidium dinophili konnte mit den Acm-Peptiden nicht abgeschwächt werden (bis 50 µg/ml), noch wurde eine toxische Wirkung auf den Wirt festgestellt (TEJMAR-KOLAR, 1984).

2.4. Mitogene Wirkung

Im Lymphozyten-Mitogenitätstest nach JOHNSON et al. (1983) zeigten die Acm-Peptide keine mitogene Wirkung auf Human- und Mäuse-Lymphocyten im Vergleich zu Concanavalin A (Verdünnungsreihe -1:5- von 1000 bis 0,06 µg/ml; Abb. 20). Ich danke Frau M. Pfeiffer und Herrn Prof. Bessler für die Durchführung der Testreihe.

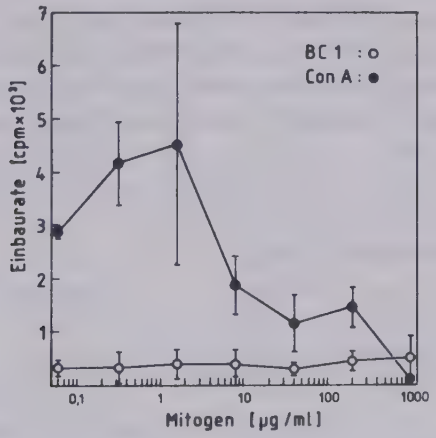


Abb. 20: Einbau von [^{3}H]-Thymidin in die DNA von Human-Lymphozyten (cpm/2,5 · 10^5 Zellen) nach Stimulation mit BC 1 (MeIle-Acm) und Con A.

3. Toxizität

1) Autotoxizität: Sporenkeimung und Wachstum der Produzenten Tü 2460 und Tü 2605 wurden in Submerskultur resp. Plattendiffusionstest in Gegenwart der Acm-Peptide nicht gehemmt.
2) Zytotoxizität: Weder an Lymphozyten noch beim Test an Dinophilus gyrociliatus wurden irgendwelche Schädigungen eukaryotischer Zellen festgestellt.

3) Akute Toxizität: Bei der Untersuchung der akuten Toxizität (LD_{50}) an NMRJ-Mäusen (18-19g) überlebten alle Tiere subcutane Gaben bis zu 320 mg/kg ohne äußerlich erkennbare Effekte.

4. Versuche im Biophotometer

Die Abhängigkeit der antibakteriellen Wirkung vom Zeitpunkt der Zugabe der Acm-Peptide zu einer wachsenden Kultur von Escherichia coli 12593/74 in Braun-Flexner Medium ist in Abb. 21 dargestellt. Dieser Testkeim war wie die meisten Bakterien Biotin-prototroph und deshalb nur zu Kulturbeginn in lag- und frühen log-Phase sensitiv für die Antimetaboliten solange noch nicht genügend eigenes Biotin synthetisiert werden konnte.

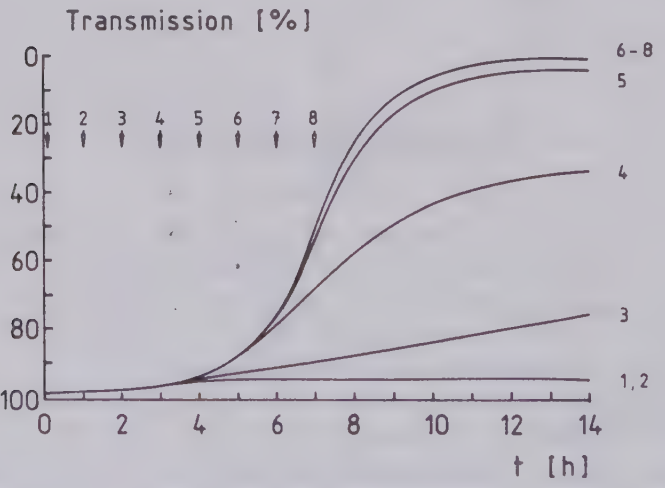


Abb. 21: Wachstum von Escherichia coli 12593/74 ($1{,}2 \cdot 10^5$ Zellen /ml in BF-Flüssigmedium) bei der Zugabe von BC 1 (MeIle-Acm, 1 µg/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten (↓).

5. Transport der Acm-Peptide

Die Aufnahme von Peptidantibiotika kann bei Mikroorganismen direkt mit chemisch-physikalischen Methoden (z.B. Messung von radioaktiven oder fluoreszenz-markierten Derivaten) oder indirekt mit biologischen Testsystemen (z.B. Messung einer Wachstumsantwort in Anwesenheit toxischer Peptide oder durch Antagonismus der Transportwege) untersucht werden(PAYNE & GILVARG, 1978).

So wurde die Aufnahme einiger Di- und Tripeptid-Antibiotika über Peptidpermeasen mit Hilfe von transportdefekten Mutanten nachgewiesen (DIDDENS, 1979; DIDDENS et al., 1976, 1979; DORGERLOH, 1980). Diese Mutanten wurden auch für entsprechende Untersuchungen mit den Acm-Peptiden verwendet (vgl.: FIEDLER, 1976). Die in der Oligopeptid-Permease (opp) geschädigte Mutante E. coli K 12 D448 war empfindlich gegen die Dipeptide BC 1,2 und 3 und resistent gegen die Tripeptide BC 4,5 und 6 (jeweils 10 µg/ml). E. coli K 12 D449 war wegen eines zusätzlichen Defektes der Dipeptid-Permease (dpp) gegen alle Acm-Peptide resistent (Tabelle 19).

Tabelle 19: Empfindlichkeit (+) von Escherichia coli K 12 (Wildtyp und transportgeschädigte Mutanten : opp^- und opp^- dpp^-) gegen die Acm-Peptide BC 1 - 6 und den Acm-Warhead im Plattendiffusionstest.

E. coli Mutante	Aktivität der Acm-Peptide (10 µg/ml)						
	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6	Acm
E. coli 12593/74	+	+	+	+	+	+	-
K 12 Wildtyp	+	+	+	+	+	+	-
K 12 D448 (opp^-)	+	+	+	-	-	-	-
K 12 D449 (opp^-dpp^-)	-	-	-	-	-	-	-

Weitere Wachstumsversuche am Biophotometer (nicht dargestellt) und in Kreuztests zeigten, daß die biologische Aktivität nicht nur am Wirkort durch Biotin antagonisiert wurde, sondern auch bei der Aufnahme in die Zellen mit verschiedenen Oligopeptiden aufgehoben werden konnte, nicht aber dagegen mit den einzelnen Aminosäuren. Zur genauen Charakterisierung der Transportwege wurden deshalb nun die oben genannten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp resp. E. coli 12593/74 bei Kreuztests mit diesen Oligopeptiden und den einzelnen Acm-Peptiden eingesetzt; zum Vergleich wurden die Peptidantibiotika Alaphosphin (ALLEN et al., 1978) und Phosphinothricyl-alanyl-alanin (GUGEL, 1971) eingesetzt, die über dpp resp. opp aufgenommen werden (DIDDENS et al., 1979) (Tabelle 20 und 21; die Doppelmutante E.coli K12 D 449 war resistent gegen alle eingesetzten Di- und Tripeptid-Antibiotika). Diese Aufhebungsmuster ließen darauf schließen, daß die Dipeptide BC 1-3 über die Di- und Oligopeptidpermeasen (dpp, opp) aufgenommen werden, während die Tripeptide BC 4-6 nur über opp in die Zellen gelangen.

Alle in diesem Versuch verwendeten Testkeime zeigten dagegen gleichermaßen schwache Empfindlichkeit gegen den Acm-Warhead (1000 µg/ml), der durch enzymatische Spaltung mit Pronase P aus BC 2 hergestellt worden war. In einem weiteren Kreuztest mit den in Tabelle 20 aufgeführten Peptiden und den 20 proteinogenen Aminosäuren wurde diese geringe Aktivität des Amiclenomycins nicht durch die Oligopeptide, sondern durch die basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Ornithin antagonisiert (Ergebnisse nicht dargestellt). Acm kann also in freier Form nur wenn es in hohem Überschuß vorliegt eines der hochspezifischen Aminosäure-Transportsysteme benutzen, in diesem Fall vermutlich das Lysin-Arginin-Ornithin-System (LAO; ROSEN, 1971,1973).

Tabelle 20: Wachstum von Escherichia coli K 12 W 1485 (WT) in Gegenwart der Acm-Peptide BC 1 - 6 (10 µg/ml) sowie - zum Vergleich - Alaphosphin (Ala_2 Ⓟ) und Triornithin (Orn_3) im Kreuztest gegen verschiedene Di- und Tripeptide (5 mM).

Peptide	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6	Ala_2 Ⓟ	Orn_3
---	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala_2	+	+	+	-	-	-	+	-
Gly_2	+	+	+	-	-	-	+	-
Leu_2	+	+	+	-	-	-	+	-
Lys-Ala	+	+	+	-	-	-	+	-
Arg-Leu	+	+	+	-	-	-	+	-
Glu-Phe	+	+	+	-	-	-	+	-
Glu-Lys	+	+	+	-	-	-	+	-
N-Ac-Ala_2	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala_3	-	-	-	+	+	+	-	+
Gly_3	-	-	-	+	+	+	-	+
Leu_3	-	-	-	+	+	+	-	+
Gly-Ala_2	-	-	-	+	+	+	-	+
Phe-Gly_2	-	-	-	+	+	+	-	+
Leu-Gly_2	-	-	-	+	+	+	-	+
Gly_4	-	-	-	+	-	+	-	+
Ala_4	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala_5	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala_6	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala_7	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Wachstum aufgrund Aufhebung der biologischen Aktivität

-: kein Wachstum

Tabelle 21: Wachstum von Escherichia coli K 12 D448 (opp^-) in Gegenwart der Acm-Peptide BC 1-6 (10 µg/ml) sowie - zum Vergleich - Alaphosphin (Ala_2 Ⓟ) und Triornithin (Orn_3) im Kreuztest gegen verschiedene Di- und Tripeptide (5 mM).

Peptide	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6	Ala_2Ⓟ	Orn_3
---	-	-	-	+	+	+	-	+
Ala_2	+	+	+	+	+	+	+	+
Gly_2	+	+	+	+	+	+	+	+
Leu_2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lys-Ala	+	+	+	+	+	+	+	+
Arg-Leu	+	+	+	+	+	+	+	+
Glu-Phe	+	+	+	+	+	+	+	+
Glu-Lys	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Ac-Ala_2	-	-	-	+	+	+	-	+
Ala_3	-	-	-	+	+	+	-	+
Gly_3	-	-	-	+	+	+	-	+
Leu_3	-	-	-	+	+	+	-	+
Gly-Ala_2	-	-	-	+	+	+	-	+
Phe-Gly_2	-	-	-	+	+	+	-	+
Leu-Gly_2	-	-	-	+	+	+	-	+
Gly_4	-	-	-	+	+	+	-	+
Ala_4	-	-	-	+	+	+	-	+
Ala_5	-	-	-	+	+	+	-	+
Ala_6	-	-	-	+	+	+	-	+
Ala_7	-	-	-	+	+	+	-	+

+: Wachstum aufgrund Aufhebung der biologischen Aktivität

-: kein Wachstum

6. Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen

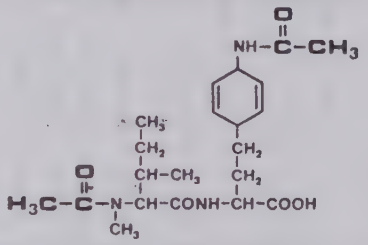
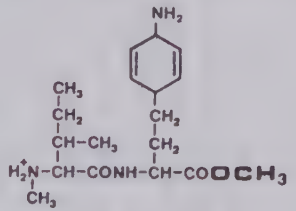
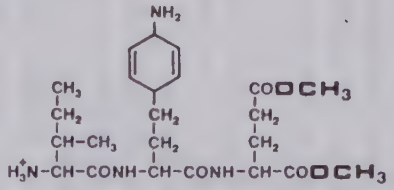
Für weiterführende Versuche wurden stellvertretend ein Dipeptid (BC 1) und ein Tripeptid (BC 5) chemisch derivatisiert (KERN, 1983). Zur Bestimmung der essentiellen Teilstrukturen der Acm-Peptide für Transport, Aktivierung und Aktivität am Wirkort wurde die Aktivität dieser an Carboxy- und Aminoterminus sowie im Cyclohexadienylsystem veränderten Verbindungen im Plattendiffusionstest gegen E. coli 12593/74 geprüft (Tabelle 22). In den meisten Fällen ging dabei die biologische Wirkung verloren. Allein bei der C-terminalen Veresterung von BC 5 blieben die bakteriostatische Wirkung und der Biotin-Antagonismus erhalten, wenn außerdem die freien Aminogruppen am Aminoende und am 4'-Kohlenstoffatom des Cyclohexadienylsystems erhalten blieben. Dagegen führte die analoge Reaktion bei BC 1 zur Inaktivierung.

Ferner wurde bei chlorierten Acm-Peptiden (nicht dargestellt) eine wachstumshemmende Wirkung auf E. coli 12593/74 beobachtet, die selbst in Gegenwart von Biotin existent war, so daß für diese Derivate ein anderer Wirkungsmechanismus angenommen werden mußte. Die Acm-Peptide können ihre biologische Aktivität offenbar nur entfalten, wenn ein freies oder methyliertes (alkyliertes) Aminoende und ein freies Carboxylende der Peptidkette sowie eine unsubstituierte 4'-Amino-2',5'-cyclohexadienyl-Seitengruppe vorliegen. Bei Tripeptiden kann der C-Terminus auch verestert sein.

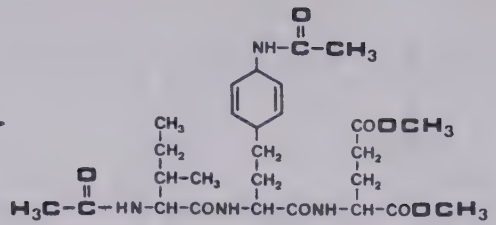
7. Intrazelluläre Aktivierung der Wirkstoffe

Da sowohl die Acm-Peptide als auch der Amiclenomycin-Grundkörper in verschiedenen Mikroorganismen biologische Aktivität zeigten, lag die Vermutung nahe, daß die für die Aufnahme über die Peptidtransportsysteme notwendigen Aminosäuren intrazellulär vom eigentlichen Wirkstoff abgespalten werden. Es sollte untersucht werden, ob diese Spaltung zur

Tabelle 22: Antibakterielle Aktivität verschiedener Derivate der Acm-Peptide (1 mg/ml)

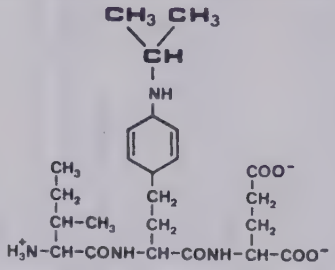
Reaktion	chemische Formel	Name	Aktivität
Acetylierung →		Ac-L-MeIle-L-Acm(Ac)	-
Veresterung →		L-MeIle-L-Acm-OMe	-
		L-Ile-L-Acm-L-Glu(OMe)-OMe	+

Acetylierung
+ Veresterung



Ac-L-Ile-L-Acm(Ac)-
-L-Glu(OMe)-OMe -

Alkylierung

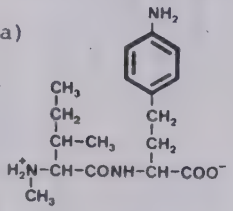


L-Ile-L-Acm-(iPr)-
-L-Glu -

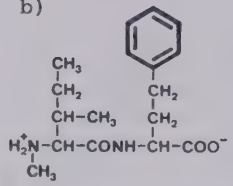
Dehydrierung

a) an Pd/C
b) thermisch

a)



b)



a) MeIle-HPhe(NH_2) -
b) MeIle-Hphe -

Entfaltung der biologischen Aktivität essentiell ist, wie es beispielsweise für die Peptidantibiotika PTC-$(Ala)_2$ (BAYER et al., 1972) und PMS-$(Ala)_2$ (PRUESS et al., 1973) beschrieben wurde.

Zur Bestätigung eines solchen Aktivierungsschrittes und zur Identifizierung der dafür notwendigen Peptidasen wurde die Empfindlichkeit verschiedener peptidasedefekter (pep^-) Mutanten von Escherichia coli K 12 und Salmonella typhimurium LT 2, die in Tabelle 23 kurz charakterisiert werden, gegen die Acm-Peptide untersucht.

Tabelle 23: Verwendete pep^- Mutanten von Escherichia coli K 12 und Salmonella typhimurium LT 2.

Mutante	Genotyp
E.coli K 12	
MTM 22	pyrD zeb Tn10 pepN308
MTM 110	pepN pepA pepB pepQ pepD (pro-lac)
9200	F^- pepN arg trp his thr leu thi gal lac mal xyl mtl rpsl
BR 158	aroB malT tonB tsx
S.typhimurium LT 2	
TN 852	leuBCD485 pepN10 pepA1 pepB1 pepD3 zfg801::Tn10
TN 858	leuBCD485 $pepN^+$ pepA1 pepB1 pepD3 zfg801::Tn10
TN 859	leuBCD485 pepN10 $pepA^+$ pepB1 pepD3 zfg801::Tn10
TN 860	leuBCD485 pepN10 pepA1 $pepB^+$ pepD3 zfg801::Tn10
TN 861	leuBCD485 pepN10 pepA1 pepB1 $pepD^+$ zfg801::Tn10

Im Plattendiffusionstest (Medium M9) war entsprechend eine multiple pep$^-$ Mutante von E. coli K 12 (MTM 110) resistent gegen die sechs Acm-Peptide; dagegen wurde das Wachstum eines peptidasepositiven Kontrollkeimes (E. coli K 12 BR 158) und zweier pep N$^-$-Mutanten von E.coli K 12 (9200 und MTM 22) gehemmt. Alaphosphin, ein Inhibitor der L-Alanin-Racemase aus Escherichia coli, der ebenfalls nach der Aufnahme über Peptid-Permeasen zur Entfaltung seiner biologischen Aktivität durch Peptidasen aktiviert werden muß (ALLEN et al., 1979), zeigte als zusätzliche Kontrolle in diesem Versuch das gleiche Sensitivitätsmuster, so daß Resistenzen der verwendeten Mutanten am Wirkort oder im Transportsystem ausgeschlossen werden konnten.

Die Empfindlichkeit der pep$^-$-Mutanten von Salmonella typhimurium gegen die Acm-Peptide ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Aktivität der Acm-Peptide (10 µg/ml) gegen Peptidase-Mutanten von Salmonella typhimurium LT 2 im Plattendiffusionstest. *)

Stamm	Peptidase Mutation	Aktivität der Acm-Peptide					
		1	2	3	4	5	6
TN 852	pepN pepA pepB pepD	-	-	-	-	-	-
TN 858	pepA pepB pepD	+	+	+	+	+	+
TN 859	pepN pepB pepD	+	+	+	+	+	+
TN 860	pepN pepA pepD	-	-	-	-	-	-
TN 861	pepN pepA pepB	-	-	-	+	+	+

*) +: Wachstumshemmung -: keine Aktivität

Diese Mutanten enthielten außer jeweils nur einer aktiven der vier häufigsten Peptidasen N, A, B und D nur - soweit sie bekannt sind - die für Prolin-Peptide spezifischen Peptidasen P und Q, die in diesem Fall ohne Bedeutung waren. Die Acm-Peptide konnten nur bei Anwesenheit der Peptidasen N oder A (Mutanten TN 858 und TN 859) und im Fall der Dipeptide BC 1-3 auch der Peptidase D (Mutante TN 861) ihre wachstumshemmende Wirkung entfalten.

IV. D I S K U S S I O N

A. Taxonomie

Die Stämme Streptomyces venezuelae Tü 2460 und Streptomyces lavendulae Tü 2605 wurden als neue Mikroorganismen beschrieben. Gegenüber anderen Stämmen dieser Arten konnten sie nach UMEZAWA (1977) insbesondere durch ihre Fähigkeit, bestimmte Sekundärmetabolite zu bilden, abgegrenzt und untereinander anhand der morphologischen Merkmale unterschieden werden. Beide Stämme bringen eine ganze Gruppe sehr nahe verwandter, in beiden Stämmen identischer Wirkstoffe hervor. Das ist keineswegs überraschend, da Antibiotikaproduzenten, wann immer sie die Fähigkeit haben, neue Wirkstoffe zu produzieren, in der Regel ein breites Spektrum von Varianten zu einer Grundstruktur bilden können (UMEZAWA, 1977, KATZ & DEMAIN, 1977) - bis über 50 wurden von einem einzelnen Mikroorganismus gebildet. Diese Vielseitigkeit der 'Variationen über ein Thema' wurde von ZÄHNER (1978, 1979) in einer Hypothese über den 'Sekundärstoffwechsel als Spielfeld der biochemischen Evolution' anschaulich dargestellt.

B. Fermentation

Ziel einer jeden Fermentationsoptimierung ist eine möglichst ertragreiche und kostengünstige Herstellung eines bestimmten Produktes im technischen oder industriellen Maßstab. Das kann durch kontinuierliche Prozeßführung mit wachsenden Zellen in relativ kleinen Reaktoren durchgeführt werden, mit immobilisierten Biokatalysatoren (mit wachsenden oder ruhenden Zellen und mit Enzymen) oder durch batch-Kulturen in besonders größen Reaktoren. Schwerpunkt dieser Arbeit war

zunächst die schnelle Herstellung relativ sauberen Rohproduktes in Mengen, die eine Strukturanalyse ermöglichten, was durch die Optimierung der Fermentationsparameter und Entwicklung einer definierten Nährlösung erreicht wurde. Anschließend wurde durch einen 'scale up'-Prozeß in den technischen Maßstab Ausgangsmaterial für weiterführende biologische und chemische Untersuchungen bereitgestellt.

Für die Entwicklung eines solchen Systems gibt es keine allgemein gültigen Richtlinien, da die Produktion von Sekundärmetaboliten von einer großen Zahl von Faktoren abhängt, die sich untereinander vielseitig beeinflussen - eine Übersicht wurde von ZÄHNER & KURTH (1982) gegeben. Die Vielzahl der beteiligten Gene wurde zum Beispiel für die Biosynthese von Chlortetracyclin von VANEK et al. (1971) auf 300 und bei der Synthese von Neomycin von anderen Autoren noch wesentlich höher eingeschätzt. In einem so komplizierten System ist ein rationales Programm zur Ausbeutesteigerung in seltenen Fällen möglich, da die Daten über die Biosynthese von Sekundärmetaboliten, über die Bereitstellung von Vorstufen aus dem Primärstoffwechsel sowie die energetischen Verknüpfungen zwischen den Stoffwechselwegen noch nicht ausreichend bekannt oder vollständig verstanden sind.

Dennoch haben sich unabhängig voneinander in verschiedenen Arbeitsgruppen sehr ähnliche Strategien entwickelt (RUTTLOFF et al., 1978; HOCKENHULL, 1981; MALIK, 1982; IWAI & OMURA, 1982), die auch dieser Fermentationsoptimierung als Leitfaden zugrunde gelegt wurden. Besondere Bedeutung kam der Zusammenstellung einer geeigneten, definierten Nährlösung zu: Die genaue Kenntnis von der Zusammensetzung des Mediums aus einzelnen, definierten Komponenten ist zum einen unverzichtbare Voraussetzung für eine exakte Untersuchung der Ansprüche eines Organismus und vor allen Dingen für die Ermittlung der Einflüsse von Regulationsmechanismen auf die Produktion von Sekundärmetaboliten. Der Vorteil definierter

Medien liegt ferner in der erleichterten Analyse einzelner Faktoren und der erhöhten Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse. Die Bestandteile komplexer Medien sind oft nicht nur wenig bekannt und zum Teil unlöslich, sondern schwanken auch je nach Charge in ihrer Zusammensetzung. Zum anderen besteht bei der Produktion niedermolekularer Naturstoffe häufig das Problem, eine relativ kleine Menge biologisch aktiver Substanzen aus einem großen Überschuß sehr ähnlicher gewöhnlicher Metabolite des Primärstoffwechsels zu isolieren, wie in diesem Fall bei der Gewinnung von Di- und Tripeptiden aus Fleischextrakt.

Beide Produktionsstämme zeigten sehr ähnliche Nährstoffansprüche und konnten unter den gleichen Betriebsbedingungen fermentiert werden. Die Sauerstoffversorgung war aufgrund des für Streptomyceten recht schnellen Wachstums kritisch, konnte aber durch hohe Rührgeschwindigkeiten im nichtlimitierenden Bereich gehalten werden. Durch Temperaturerhöhung und pH-statische Kulturführung wurde die Antibiotika-Produktion stimuliert.

Die Acm-Peptide stellen keine klassischen Idiolite im Sinne von BU'LOCK et al. (1975) dar, deren Produktion einsetzt, wenn Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphat-Quelle erschöpft sind. Vielmehr sind Wachstum und Produktion bei beiden Stämmen eng miteinander korreliert. Bei hoher Aktivität des Primärstoffwechsels stehen in der Wachstumsphase somit genügend Aminosäuren als Vorstufen für die Acm-Peptide zur Verfügung, wobei die Biogenese des Acm-Grundkörpers noch offen ist. Dennoch werden auch in der stationären Phase mit ruhenden Zellen gleich hohe Ausbeuten erzielt.

Die Auswahl der Bestandteile für die definierte Nährlösung wurde unter besonderer Berücksichtigung der Regulationsmechanismen vorgenommen, welche die Synthese von Sekundärmetaboliten beeinflussen. Sie wurden von MARTIN & DEMAIN

(1980) und MALIK (1982) ausführlich beschrieben.

Bei der Variation der Stickstoff-Quellen wurden mit Ammoniumsulfat die höchsten Erträge erzielt. Der Abbau stickstoffhaltiger Substrate und die Synthese von Sekundärmetaboliten sowie ihrer Vorstufen wird aber oft durch Ammoniumionen auf dem Weg der Repression oder Hemmung der Enzyme reguliert (MARTIN, 1978; GRÄFE, 1982). Die Mechanismen dieser Stickstoff-Regulation sind aber bis heute wenig verstanden (DREW & DEMAIN, 1977; AHARONOWITZ & DEMAIN, 1977; AHARONOWITZ, 1980). Nach ŌMURA et al. (1980) kann dieses Regulationsprinzip umgangen werden, indem durch Zugabe von $MgH(PO_4)_2$ freie Ammoniumionen komplexiert und im Lauf der Fermentation langsam wieder an das Medium abgegeben werden. Dieser Mechanismus entspricht dem 'slow-feeding' mit Glukose (MARTIN & McDANIEL, 1974), das zur Aufhebung der Kohlenstoff-Katabolit-Regulation angewendet wird (s.u.). Für die Produktion der Acm-Petide mit Tü 2460 konnte der 'Magnesiumphosphat-Effekt' ausgenutzt und die Ausbeute um nahezu 50 % bis auf 1000 mg_{BC} l/l gesteigert werden, während bei Tü 2605 der Einfluß der Stickstoff-Regulation nur bei hohen Ammoniumsulfat-Konzentrationen gerade aufgehoben werden konnte.

Die Synthese vieler Antibiotika wird durch schnell fermentierbare Kohlenstoff-Quellen, insbesondere Glukose, gehemmt (MARTIN & DEMAIN, 1980). Wenn mehrere Kohlenhydrate nebeneinander vorliegen, wird die Synthese von Antibiotika bei schnellem Wachstum unterdrückt, bis die Glukose abgebaut ist. Dieser Mechanismus sichert manchen Organismen das Überleben, die in der Wachstumsphase gegen ihre eigenen Produkte empfindlich sind (MARTIN & AHARONOWITZ, 1983). Die molekularen Mechanismen der Kohlenstoff-Katabolit-Regulation sind nur in wenigen Fällen bekannt (MARTIN, 1978), wobei die Rolle von cAMP in diesem System noch immer kontrovers diskutiert wird (MARTIN, 1976; RAGAN & VINING, 1978). Eine Um-

gehung dieser Regulation ist durch 'slow-feeding' mit Glukose (MARTIN & McDANIEL, 1974) oder durch den Einsatz anderer Kohlenstoff-Quellen möglich, zum Beispiel mit Glycerin als Substrat bei der Produktion von Cephamycin, Butirosin oder Puromycin (MARTIN, 1978). Die Synthese der hier untersuchten Acm-Peptide wurde durch die Verwendung von Glycerin ebenfalls stimuliert und die 'Kohlenstoff-Katabolit-Regulation' zumindest teilweise aufgehoben.

Die Synthese der Acm-Peptide wurde dagegen durch den Phosphatgehalt des Mediums kaum beeinflußt und konnte auch nicht mehr gehemmt werden, wenn die Produktion einmal begonnen hatte, wie es für die Candicidin-Synthese beschrieben wurde (MARTIN & DEMAIN, 1976).

Das Feld der Katabolitregulation im Sekundärstoffwechsel befindet sich noch immer in einer descriptiven Phase, in der nach geeigneten Methoden und Modellen noch gesucht wird (DEMAIN, 1982).

In der stationären Phase blieb das Mycel über lange Zeit stabil (bis über 250 Stunden). Eine Verlängerung der Produktionsphase sollte nach Vorversuchen zum kontinuierlichen 'feeding' (Ergebnisse nicht dargestellt) möglich sein. Im Besonderen soll aufgrund dieser Eigenschaften für eine weitergehende Optimierung der Produktion der Acm-Peptide, möglicherweise durch gerichtete Fermentation zur Beeinflussung des Produktenspektrums, die Entwicklung eines kontinuierlichen Systems mit immobilisierten Zellen vorgeschlagen werden. Diese Methode wird zwar bis heute nicht für die Produktion eines der über 100 kommerziell hergestellten Antibiotika eingesetzt, bietet aber eine Reihe von Vorteilen, zum Beispiel durch kontinuierliche Verfahrensweise ohne Gefahr eines 'washout', durch die Reduzierung nicht produktiver Wachstumsphasen und durch die gute Kontrollmöglichkeit der Wachstumsrate (KARUBE et al., 1984).

C. Wirkungsweise

Aus den Kulturen der Streptomyceten Tü 2460 und Tü 2605 wurden 6 Biotin-Antimetaboliten (BC 1-6) isoliert, die nach ihrem gemeinsamen Grundkörper Amiclenomycin (Acm), einer ungewöhnlichen Aminosäure, Acm-Peptide genannt wurden. BC 1 und BC 3 sind identisch mit den von BAGGALEY et al. (1969) und FIEDLER (1976) ebenfalls aus Streptomyceten isolierten Peptiden Stravidin und MSD-235 S 2, deren biologische Aktivität auf die von OKAMI et al. (1974) beschriebene Wirkung des Amiclenomycins zurückgeführt wurde.

Für die neuen Verbindungen BC 2,4,5 und 6 konnte der gleiche Wirkungsmechanismus nachgewiesen werden: Die KAPA-DAPA-Transaminase wird durch den Acm-Grundkörper aufgrund der Strukturanalogie zum natürlichen Substrat (BAGGALEY et al., 1969) und der stärkeren funktionellen Gruppen (HOTTA et al., 1975) nicht-kompetitiv gehemmt und damit die Biotin-Biosynthese unterbrochen. Solange in einer Bakterienkultur bis zur Zugabe dieser Antibiotika der intrazelluläre Biotin-Pool noch nicht für die Funktionsfähigkeit der biotinabhängigen, CO_2-übertragenden Enzyme über längere Zeit ausreicht, wird das Wachstum von Bakterien gehemmt. Zusätzlich kann dieser Effekt durch die irreversible Bindung freien Biotins mit Avidin oder anderen Proteinen wie Streptavidin und möglicherweise BC L synergistisch verstärkt werden.

Vor allem gram-negative Bakterien waren empfindlich gegen die Acm-Peptide, während das Wirkspektrum von Acm nach OKAMI et al. (1974) eng auf die Mycobacteriaceae begrenzt ist. Dieser scheinbare Widerspruch konnte durch den Nachweis der Transportwege für diese Substanzen erklärt werden.

Die meisten gram-positiven Bakterien besitzen mit den extrazellulären Peptidasen (PAYNE, 1980a) einen natürlichen Schutz gegen Peptidantibiotika, deren Wirkstoffe nach der Hydrolyse außerhalb der Zellen nicht mehr über Peptid-Permeasen aufgenommen werden können.

Solche extrazellulären Peptidasen findet man auch bei Neurospora crassa (WOLFINBARGER & MARZLUF, 1975), jedoch kommen sie bei den übrigen bisher untersuchten Pilzen (WOLFINBARGER, 1980) und Hefen (BECKER & NAIDER, 1980) nicht vor. Andererseits sind viele Arten für Biotin auxotroph und entbehren damit von vorn herein des Targets für den Antimetaboliten. Mit einer Auswahl von prototrophen Arten, die auf Minimalmedium ohne Zusatz von Vitaminen wachsen können, wurde aber im Differenztest erstmals auch eine antifungische Wirkung gegen zwei pathogene Ascomyceten gefunden.

Seit etwa zehn Jahren wurde bei der von UMEZAWA (1972, 1982) eingeleiteten Suche nach niedermolekularen Enzyminhibitoren unter anderem Wirkstoffe gefunden, die das Immunsystem beeinflussen, insbesondere den Acm-Peptiden strukturell verwandte Peptide, zum Beispiel der Peptidase-Inhibitor Bestatin (UMEZAWA et al., 1976). Im Lymphozytentest konnte jedoch keine mitogene Wirkung der Acm-Peptide festgestellt werden.

Solchen niedermolekularen Peptiden wird auch besondere Bedeutung bei der Untersuchung natürlicher Abwehrmechanismen bei Pflanzen, insbesondere bei der induzierten Resistenz, beigemessen, die ausführlich von SEQUEIRA (1984) beschrieben wurden. Sie wirken dort vermutlich als Induktoren der Synthese von Proteinaseinhibitoren und anderen Proteasen der Pflanzen, welche die Infektion durch phytopathogene Keime verhindern, haben jedoch keine Spezifität für bestimmte Keime. Obwohl es erste Erfolge mit Extrakten aus Pilz- und Bakterienkulturen beispielsweise bei der Eindämmung von Infektionen durch Rostpilze (Uromyces phaseoli) und echten

Mehltau (Erysiphe graminis) an Kulturpflanzen unter praktischen Anbaubedingungen gibt (SCHÖNBECK et al., 1982), bleibt die großflächige Anwendung zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten zunächst eine theoretische Möglichkeit, solange die Wirkstoffe nicht eingehend charakterisiert sind. Mit den Acm-Peptiden konnte direkt gegen die Pilze 'in vivo' auf den Testpflanzen keine Wirkung erzielt werden, und auch hinsichtlich der Resistenzinduktion wurden maximal marginale Effekte erzielt.

Weitere Experimente zur Wirkung 'in vivo' gegen Protozoen verliefen mit negativem Befund. Möglicherweise war in diesen Organismen eine dem Wirkungsmechanismus in Bakterien entsprechende Aktivierung des Acm-Warheads verhindert, wenn Peptid-Antibiotika generell gegen die Hydrolyse durch Peptidasen und Proteasen tierischen und pflanzlichen Ursprungs resistent sind (KATZ & DEMAIN, 1977).

Peptide bis zu einem Molekulargewicht von 650 gelangen bei gram-negativen Bakterien, die keine extrazellulären Peptidasen besitzen, wie zum Beispiel Escherichia coli und Salmonella typhimurium, durch relativ unspezifische passive Diffusion (BRAUN, 1977) durch wassergefüllte Kanäle der äußeren Membran, die Porine (NIKAIDO & NAKAE, 1979), in den periplasmatischen Raum. Von dort werden sie über Peptid-Permeasen, Mehrkomponentensysteme der inneren Membran mit einem assoziierten periplasmatischen Bindeprotein (HIGGINS & HARDIE, 1983), durch aktiven Transport (PAYNE, 1980b) in das Cytoplasma aufgenommen, wenn sie bestimmte strukturelle Voraussetzungen erfüllen (PAYNE & GILVARG, 1978; PAYNE, 1980a; siehe Abb. 22):

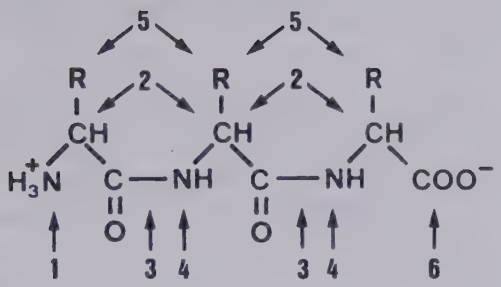


Abb. 22: Strukturelle Anforderungen der Peptid-Permeasen bei Escherichia coli an ihre Substrate nach dem Modell von PAYNE (1980a).

1 : Die α-Aminogruppe kann monosubsituiert sein, doch muß die positive Ladung erhalten bleiben, z.B. durch Alkylierung, nicht aber durch Acylierung.
2 : Es besteht Stereospezifität für L-Aminosäuren.*)
3 : Die α-Peptidbindungen sind essentiell.
4 : Der Stickstoff kann methyliert sein.
5 : Die Natur der Seitenketten ist unbedeutend; möglich sind : natürliche oder substituierte Reste, synthetisches Analoga.
6 : Die Carboxylgruppe muß für den Transport auf dem Dipeptidweg in freier Form vorliegen. Das Peptid kann aber, sobald sie substituiert ist, wie alle Tripeptide, über die Oigopeptidpermease aufgenommen werden.

*) MORLEY et al. (1983) gelang bei Untersuchungen zum Transport von neuen D-Aminoxiderivaten von Aminosäuren der Nachweis, daß diese Stereospezifität der Peptid-Permeasen nicht immer erfüllt ist. Insbesondere läßt sich bei Tripep-

tiden für die C-terminale Aminosäure eine Art 'Wobble-Hypothese' aufstellen, daß in dieser Position D-Aminosäuren oft toleriert werden.

DIDDENS et al. (1976, 1979) haben die Aufnahme via Dipeptid- (dpp) und Oligopeptid-Permeasen (opp) erstmals für eine Reihe von niedermolekularen Peptid-Antibiotika zeigen können. Hier wurde der Nachweis eines solchen Transportweges für die Acm-Peptide mit TOR-Mutanten von Escherichia coli und durch den Antagonismus mit verschiedenen Oligopeptiden im Kreuztest und Versuchen am Biophotometer geführt.

Nach der Aufnahme in die Zellen müssen die dafür benötigten Aminosäuren innerhalb des Cytoplasmas durch Peptidasen von dem eigentlichen Wirkstoff wieder abgespalten werden, der danach erst seine Aktivität am Wirkort entfalten kann. Unter Verwendung einiger Mutanten von Salmonella typhimurium, die jeweils nur eine aktive Peptidase enthielten, konnten die für diese Aktivierung der Acm-Peptide notwendigen Peptidasen erstmals identifiziert werden: Die Peptidasen A und N weisen relativ breite Substratspektren auf und spalten alle sechs Acm-Peptide, während die Dipeptide BC 1-3 auch durch die Dipeptidase D aktiviert werden.

BC 1,3 und 4 weisen eine ungewöhnliche Methylierung der endständigen Aminogruppe auf, die nur bei Antibiotika aus Pilzen und Actinomyceten und nicht bei solchen aus Bacilli beobachtet werden (KATZ & DEMAIN, 1977). Sie werden dennoch gleichermaßen gut durch die Peptidpermeasen aufgenommen aber deutlich langsamer von den Peptidasen gespalten (PAYNE, 1974, 1976). Für eine eventuelle Voll- oder Semisynthese von Peptidantibiotika ist ferner von Bedeutung, daß die Einführung weiterer Methylgruppen am Stickstoff der Peptidbindung zur Resistenz gegen die enzymatische Hydrolyse führen würde und nach verlangsamtem Transport die intakten Peptide in der Zelle akkumulieren (PAYNE, 1977).

Durch chemische Derivatisierung wurden verschiedene essentielle Teilstrukturen der Acm-Peptide BC 2 und 5 so verändert, daß einerseits die strukturellen Voraussetzungen für den Transport via dpp- und opp-System nach dem Modell von PAYNE nicht mehr erfüllt waren, zum Beispiel Acetylierung am N-Terminus. Die Veresterung am C-Terminus des Tripeptides BC 5 hatte dagegen diesem Modell entsprechend keinen Einfluß auf die Transporteigenschaften, so daß die biologische Aktivität erhalten blieb. Andererseits wurden durch weitere Derivatisierungen Resistenzen am Wirkort des Amiclenomycins hervorgerufen. Die analoge Veresterung der Carboxylgruppe des Dipeptides BC 2 führte zur Inaktivierung, wobei sich zwei Effekte überdecken: Zwar benötigen Dipeptide für die Aufnahme über das dpp-System ein freies Carboxylende, doch könnten sie in Escherichia coli zum Beispiel in die Zellen auch über die Oligopeptid-Permease gelangen, welche diese Spezifität nicht aufweist, so daß die Aktivität erhalten bliebe. Jedoch geht durch die Veresterung die negative Ladung der freien Carboxylgruppe des Amiclenomycins verloren, die nach dem Hinweis von BAGGALEY et al., (1969) auf die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Acm und KAPA, dem natürlichen Substrat des hier gehemmten Enzyms, als essentiell für die Bindung des Wirkstoffs an die Transaminase angesehen werden muß (Abb. 23).

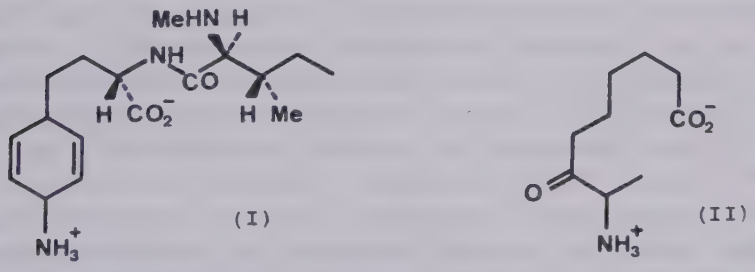


Abb. 23: Strukturanalogie zwischen MeIle-Acm (I) und KAPA (II) - nach BAGGALEY et al. (1969).

Die Resistenz von pep⁻-Mutanten von Salmonella typhimurium auch gegen unsubstituierte Dipeptide (BC 1-3) belegt, daß die N-terminalen Aminosäuren vom Amiclenomycin abgespalten werden müssen. Möglicherweise könnte die α-ständige Aminogruppe des Amiclenomycins, wenn es die aminoständige Position eines Acm-Dipeptides einnimmt, durch Alkylgruppen ohne Einbuße der Aktivität substituiert werden.

Die Derivatisierungen der η-ständigen Aminogruppe führte in allen Fällen zum vollständigen Aktivitätsverlust. Ebenso ist die Wannenform des 2,5-Cyclohexadienylsystems unabdingbar für die biologische Aktivität (HOTTA et al., 1975), auch wenn bei der Aromatisierung die η-Aminogruppe erhalten bleibt.

Der Acm-Warhead ist also nach Abspaltung der Transport-Aminosäuren in allen seinen Strukturelementen (freie Carboxyl-, ß-Amino- und η-Aminogruppen sowie 2,5-Cyclohexadienylsystem) in höchstem Maße auf seine Aktivität als Biotin-Antimetabolit abgestimmt und wird durch jede Veränderung des Moleküls inaktiviert.

Der Acm-Grundkörper erfüllt nicht die Bedingungen zur Aufnahme durch die Peptid-Permeasen, sondern konkurriert mit Lysin, Arginin und Ornithin um den Transport durch eines der für diese basischen Aminosäuren spezifischen Systeme. Wahrscheinlich ist es das gemeinsam benutzte LAO-System (ROSEN, 1971, 1973), das damit eine für Aminosäure-Permeasen hohe Toleranz gegenüber der Struktur des Substrates zeigt.

Das Wirkspektrum des Amiclenomycins wird also durch die Eigenschaften des Transportvehikels mit der Anzahl der Aminosäuren im Peptid und der Art der Substituenten am Peptid-'backbone' bestimmt und hängt von der Ausstattung der - Biotin-prototrophen - Targetzellen mit den entsprechenden Transportsystemen und Peptidasen ab, deren Bedeutung für

die Pathogenität dieser Wirkstoffe damit unterstrichen wird.

Die Aufnahme hydrophiler Antibiotika erfolgt in Bakterien weitgehend über energieabhängige Carrier gegen einen Konzentrationsgradienten. Hierfür haben sich im Lauf der Evolution keine speziellen Systeme bei Bakterien manifestiert, vielleicht weil die Präsenz eines bestimmten Antibiotikums in der Natur zu selten für die Auslese und Erhaltung einer Rezeptorspezifität ist. Im Gegenteil hatten gerade diejenigen Organismen einen Selektionsvorteil, welche sich der Wirkung eines solchen Hemmstoffes aufgrund von Transport- oder Wirkortresistenzen entziehen konnten. Andererseits können diejenigen Antibiotika ungehindert an ihren Wirkort gelangen, welche durch Analogie zu natürlichen Substraten oder Bindung an entsprechende Transportverbindungen die Aufnahmewege für essentielle Metabolite mißbrauchen können, und so gegen Eindringungsresistenzen geschützt sind (ZÄHNER, 1977; DIDDENS et al., 1976, 1979; KADNER, 1978; RINGROSE, 1980; CHOPRA & BALL, 1982).

Die Acm-Peptide entsprechen diesem Vehikel-Warhead-Konzept und bieten einen Anstoß zur Herstellung neuer (semi)synthetischer Hemmstoffe mittels Kopplung des Warheads an andere Transportvehikel wie zum Beispiel bestimmte Siderophore, um das Wirkprofil gezielt zu verändern bzw. zu erweitern. Theoretisch wäre auch durch peptidartige Verknüpfung mehrerer Wirkstoffe (zum Beispiel Amiclenomycin, Phosphinothricin und Aminoethylphosphonsäure oder gewöhnliche Aminosäuren als 'Spacer' zwischen zwei Warheads) die Konstruktion neuer 'Mehrkomponenten-Wirkstoffe' denkbar, die nach Aufnahme über Peptidpermeasen und Aktivierung durch intrazelluläre Peptidasen gleichzeitig an zwei oder gar drei voneinander unabhängigen Wirkorten aktiv werden könnten (in diesem Beispiel an der KAPA-DAPA-Transaminase der Biotin-Biosynthese, der Glutamin-Synthetase im zentralen Aminosäure-Stoffwechsel und an der L-Alanin-Racemase in der Zellwandsynthese).

Amiclenomycin ist durch chemische Vollsynthese nicht zugänglich und kann heute ausschließlich biologisch durch verschiedene Streptomyceten als einzelne Aminosäure oder in Peptidform fermentativ hergestellt werden. Nach Vorversuchen mit Hemmstoffen der ribosomalen Proteinsynthese und Inhibitoren aktiver SH-Gruppen (zum Beispiel Jodacetat; Ergebnisse nicht dargestellt) gibt es Hinweise, daß die Biosynthese der Acm-Peptide wie bei vielen Peptidantibiotika nach dem Thiotemplate-Mechanismus (KLEINKAUF & KOISCHWITZ, 1974; KURAHASHI, 1981) nichtribosomal an einem Multienzymkomplex stattfindet. Danach sollte es möglich sein, auch neue Acm-Peptide durch 'in vitro'-Synthese am isolierten Enzymkomplex oder 'in vivo' mittels gerichteter Fermentation oder Mutasynthese nach SHIER et al. (1969) herzustellen. Sie werden als Modell für weitere grundlegende Studien zur Wirkungsweise von Peptiden auf molekularer Ebene des Transports, des Targets und der Aktivität von Peptidasen von Nutzen sein. Dieses 'illicit-transport-concept' (AMES et al., 1973) gewinnt zunehmend an Bedeutung für die gezielte Suche nach neuen Wirkstoffen und wird die Entwicklung auf dem Gebiet der antimikrobiellen Chemotherapie weiter vorantreiben, sowie neue Impulse für weitere Indikationsgebiete geben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Streptomyces venezuelae Tü 2460 und Streptomyces lavendulae Tü 2605 wurden als neue Mikroorganismen beschrieben, welche neue Biotin-Antimetaboliten produzieren.

Durch Optimierung der Fermentationsparameter und der Nährlösung wurde die Produktion der Antibiotika von anfänglich 15 $mg_{BC\ 1}/l$ um den Faktor 52 auf 790 $mg_{BC\ 1}/l$ stimuliert. Ein definiertes Medium wurde entwickelt, mit dem die Herstellung eines fremdstoffarmen Rohproduktes gelang und die Isolierung der Wirkstoffe ermöglicht wurde.

In diesem Medium wurde bei der Untersuchung der Regulationsmechanismen für die Antibiotikasynthese eine Kohlenstoff-Katabolit-Repression durch Glukose und eine Stickstoff-Regulation durch Ammoniumsulfat nachgewiesen. Diese Regulationseffekte konnten durch die Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle in der Nährlösung und durch den Zusatz von $MgHPO_4 \cdot 3\ H_2O$ aufgehoben und die Ausbeute nochmals um ca. 26% auf 1000 $mg_{BC\ 1}/l$ erhöht werden.

Die Stämme Tü 2460 und Tü 2605 scheiden vier neue (BC 2,4-6) und zwei bekannte Biotin Antimetaboliten (BC 1 = Stravidin und BC 3 = MSD-235 S2) ins Medium aus, die das Wachstum zahlreicher klinisch relevanter gram-negativer Bakterien und zweier pathogener Ascomyceten (Trichophyton mentagrophytes und Mycothypha africana) hemmen.

Es handelt sich um nicht toxische, unter physiologischen Bedingungen sehr stabile Di- und Tripeptid-Antibiotika, deren biologisch aktive Komponente, die Aminosäure Amiclenomycin, an eine bzw. zwei gewöhnliche Aminosäuren gebunden ist.

Bei Untersuchungen zur Wirkungsweise der neuen Acm-Peptide wurde der Nachweis geführt, daß die Antibiotika zum Beispiel in Escherichia coli über Peptid-Permeasen (dpp, opp) aufgenommen werden, und im Cytoplasma der Wirkstoff Amiclenomycin durch die Peptidasen A oder N, bei den Dipeptiden BC 1-3 auch durch die Dipeptidase D, abgespalten wird.

Das Amiclenomycin hemmt dann die Biotin-Biosynthese durch nichtkompeptitive Bindung an die KAPA-DAPA-Transaminase aufgrund seiner Strukturanalogie und stärkerer funktioneller Gruppen im Vergleich zum natürlichen Substrat.

Die wachstumshemmende Wirkung kann durch ein ebenfalls von diesen Streptomyceten gebildetes Polypeptid (BC L), welches nicht identisch ist mit Avidin und Streptavidin, synergistisch verstärkt oder durch die Zugabe von Biotin aufgehoben werden.

Die Acm-Peptide wurden als Beispiele für das Vehikel-Warhead-Modell vorgestellt und Möglichkeiten der 'in vitro' Synthese diskutiert.

V. L I T E R A T U R

AIBA, S.; A.E.HUMPHREY & N.F.MILLIS: Biochemical engineering, 2. Ed. Tokyo: University of Yokyo Press (1973).

AHARONOWITZ, Y.: Nitrogen metabolite regulation on antibiotic biosynthesis. Ann. Rev. Microbiol. 34, 209-233 (1980).

AHARONOWÍTZ, Y. & A.L.DEMAIN: Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by Streptomyces clavuligerus. Arch. Microbiol. 115, 169-173 (1977).

ALLEN, J.G.; F.R.ATHERTON, M.J.HALL, C.H.HASALL, S.W.HOLMES, R.W.LAMBERT, L.J.NISBET & P.S.RINGROSE: Phosphonopeptides, a new class of synthetic antimicrobial agents. Nature 272, 56-58 (1978).

ALLEN, J.G.; F.R.ATHERTON, M.J.HALL, C.H.HASALL, S.W.HOLMES, R.W.LAMBERT, L.J.NISBET & P.S.RINGROSE: Phosphonopeptides, as antibacterial agents, alaphosphin and related phosphonopetides. Antimicrob. Agents & Chemother. 15, 684-695 (1979).

AMES, B.N.; FERRO-LUZZI, G.AMES, J.D.YOUNG, D.TSUCHIDA & J.LECOCQ: Illicit transport: The oligopeptide permease. Proc. Nat. Sci. USA 70, 456-458 (1973).

van ARX, E.; M.FAMPEL & M.BRUGGER: Das 4,4'-Tetra-methyldiaminodiphenylmethan Reagens (TDM). J. Chromatogr. 120, 224-228 (1976).

AUDEN, J.; J.GRUNER, J.NÜESCH & F.KNÜSEL: Some statistical methods in nutrient medium optimalization. Pathol. Microbiol. 30, 858-866 (1967).

BAGGALEY, K.H.; B.BLESSINGTON, C.P.FALSHOW, W.D.OLLIS, L.CHAIET & F.J.WOLF: The constitution of stravidin, a novel microbiological product. J. Chem. Soc. Chem. Commun. pp. 101-102 (1969).

BAYER, E.; K.H.GUGEL, K.HÄGELE, H.HAGENMAIER, S.JESSIPOW, W.A.KÖNIG & H.ZÄHNER: Phosphinothricin und Phosphinothricyl-alanyl-alanin. Helv. Chim. Acta 55, 224-239 (1972).

BECKER, J.M. & F.NAIDER: Transport and utilization of peptides by yeast. In: Microorganisms and nitrogen sources. PAYNE, J.W. (Ed.). Chichester, New York, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons (1980).

BERGTER, F.: Wachstum von Mikroorganismen, 2. Aufl. Weinheim: Verlag Chemie (1983).

BESKOV, S.: Technisch chemische Berechnungen, 3. Aufl. Leipzig: VEB Deutscher Verlag (1962).

BESSLER, W.G.; R.B.JOHNSON, K.H.WIESMÜLLER & G.JUNG: B-lymphocyte mitogenicity in vitro of a synthetic lipopeptide fragment derived from bacterial lipoprotein. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 767-770 (1982).

BETINA, V.; M.BETINOVA & M.KUTKOVA: Effects of cyanein on growth and morphology of pathogenic fungi. Arch. Microbiol. 55, 1-16 (1966).

BONIFAS, V: Determination de l'association synergique binaire d'antibiotics et de sulfonamides. Experientia 8, 234-235 (1952).

BÖYUM, A.: Separation of leucocytes from blood and bone marrow. II. Isolation of leucocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97), 31-50 (1968).

BRAUN, H.: Zur Assimilation und Dissimilation bei Bakterien. Zentralbl. Bakteriol., 1. Abt. 122, 5-31 (1931).

BRAUN, V.: Membranpermeation und Antibiotika-Resistenz bei Bakterien. Naturwissenschaften 64, 126-132 (1977).

BU'LOCK, J.D.; D.HAMILTON, M.A.HULME, A.J.POWELL, H.M.SMALLEY, D.SHEPERD & G.N.SMITH: Metabolic development and secondary biosynthesis in Penicillium urticae. Can. J. Microbiol. 11, 765-778 (1975).

CHAIET, L.; T.W.MILLER, F.TAUSIG & F.J.WOLF: Antibiotic MSD-235 . II. Separation and purification of synergistic compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 1963, 28-32.

CHAIET, L. & F.J.WOLF: The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomycetes. Arch. Biochem. 106, 1-5 (1964).

CHOPRA, I. & P.BALL: Transport of antibiotics into bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 23, 183-240 (1982).

CRAIG, L.C.: Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. Application to Atabrine. J. Biol. Chem. 150, 33-45 (1943).

CYBULLA, J.; H.BRÜCKNER, G.JUNG, T.WIPPERFÜRTH & W.G.BESSLER: The mitogenic principle of Escherichia coli lipoprotein. B-lymphocyte mitogenicity of N-palmitoyl-cysteine and N-palmitoyl glutamic acid α-methyl esters. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 1389-1396 (1980).

CZAPEK, F.: Untersuchungen über Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung bei Pflanzen. Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol. 1, 540-560 (1902-1903) und 3, 47-66 (1902-1903).

DEMAIN, A.L.: Catabolite regulation in industrial microbiology. In: Overproduction of microbial products. KRUMPHANZEL, V.; B.SIKYTA & Z.VANEK (Eds.). London, New York, Paris, San Diego, San Franzisco, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press (1982).

DIDDENS, H.: Untersuchungen zum Transport von Antibiotika über die Aufnahmesysteme für Oligopeptide und Sideramine. Dissertation, Universität Tübingen (1979).

DIDDENS, H.; H.ZÄHNER, E.KRAAS, W.GÖHRING & G.JUNG: On the transport of tripeptide antibiotics in bacteria. Europ. J. Biochem. 66, 11-23 (1976).

DIDDENS, H.; M.DORGERLOH & H.ZÄHNER: On the transport of small peptide antibiotics in bacteria. J. Antibiot. 32, 87-90 (1979).

DITTMER, K.; V.DuVIGNEAUD, P.GYÖRGY & C.S.ROSE: A study of biotin sulfone. Arch. Biochem. 4, 229-242 (1944).

DITTMER, K. & V.DuVIGNEAUD: Antibiotic activity of imidazolidone aliphatic acids. J. Biol. Chem. 169, 63-70 (1947).

DRANDAREVSKI, C.: persönliche Mitteilung (1983).

DREW, S.W. & A.L.DEMAIN: Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31, 343-356 (1977).

DORGERLOH, M.: Vehicle-Warhead-Konzept zur Aufnahme natürlicher und synthetischer Hemmstoffe. Dissertation, Universität Tübingen (1980).

EAKIN, R.E.; E.E.SNELL & R.J.WILLIAMS: The concentration and the assay of Avidin, the injury-producing protein in raw egg white. J. Biol. Chem. 140, 535-543 (1941).

EHRLICH, J.; Q.R.BARTZ, R.M.SMITH & D.JOSLYN: Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. Science 106, 417 (1947).

EISENBERG, M.A. & G.L.STONER: Biosynthesis of 7,8-Diaminopelargonic acid, a biotin intermediate, from 7-keto-8-aminopelargonic acid and S-adenosylmethionin. J.Bacteriol. 108, 1135-1140 (1971).

ETTLINGER, L.; R.CORBAZ & R.HÜTTER: Zur Systematik der Actinomyceten. 4, Eine Arteinteilung der Gattung Streptomyces WAKSMANN et HENRICI. Arch, Mikrobiol. 31, 326-358 (1958).

FAHMY, A.R.; A.NIEDERWIESER, G.PATAKI & M. BRENNER: Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren auf Kieselgel G (2.Mitteilung): Eine Schnellmethode zur Trennung und zum qualitativen Nachweis von 22 Aminosäuren. Helv. Chim. Acta 44, 2022-2026 (1960).

FALCAO de MORAIS, J.O. & M.H.DALIA MAIA: Um estudo taxonomico em torno do streptomyces lavendulae - S. lavendulae var. brasilicus nov. spec.. Rev. Inst. Antibiot., (Recife) 1, 69-87 (1958).

FAWCETT, J.K. & J.E.SCOTT: A rapid method for the determination of urea. J. Clin. Path. 13, 156-159 (1960).

FIECHTER, A. & K.vonMEYENBURG: Automatic analysis of gas exchange in microbial systems. Biotechnol. Bioeng. 10, 535-540 (1968).

FIEDLER, E.: Über zwei homologe Peptidantibiotika, Substanz A (MSD-235 S 2) und Substanz B (MSD-235 S 3). Dissertation, Universität Tübingen (1976).

GOOD, N.E.; G.D.WINGET, W.WINTER, T.N.CONNOLLY, S.IZAWA & R.M.M.SINGH: Hydrogen ion buffers for biological research. Biochemistry 5, 467-477 (1966).

GRÄFE, U.: Relevance of microbial nitrogen metabolism to production of secondary metabolites. In: Overproduction of microbial products. KRUMPHANZEL V.; B.SIKYTA & Z.VANEK (Eds.). London, New York, Paris, San Diego, San Franzisco, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, (1982).

GREEN, N.M.: Avidin. Adv. Protein Chem. 29, 88-133 (1975).

GRUNDY, W.E.; A.L.WHITEMAN, E.G.RDZOK, E.J.RDZOK, M.E.HANES & J.C.SYLVESTER: Actithiazic acid. I. Microbiological studies. Antibiot. Chemother. 2, 399-408 (1952).

GUGEL, K.H.: Isolierung und Wirkungsweise von Phosphinotricyl-alanyl-alanin. Ein Antibiotikum aus Streptomyces viridochromogenes. Dissertation, Universität Tübingen (1971).

GYÖRGY, P. in: The vitamines. SEBELL,jr., W.H. & R.S.HARRIS (Eds.), pp. 527-571. New York: Academic Press, 1954.

GYÖRGY, P.; C.S.ROSE, K.HOFMAN, D.B.MELVILLE & V.DuVIGNEAUD: A further note on the identity of Vitamin H with biotin. Science 92, 609 (1940).

HAMILL, R.L.: General approaches to fermentation screening. Jap. J. Antibiot. 30, Suppl., 164-173 (1977).

HANKA, L.J.: Mechanism of action of psicofuranine. J. Bacteriol. 80, 30-36 (1960).

HANKA, L.J.: In vitro screen for antimetabolites. Proc. Int. Congr. Chemother., 5th, 1967 Vol. III, pp. 351-357 (1968).

HANKA, L.J.: Results of in vitro screening for antimetabolites. Proc. Internat. Congr. Chemother. 8th 3, 118-122 (1973).

HANKA, L.J.; M.E.BERGY & R,B.KELLY: Naturally occuring antimetabolite antibiotic related to biotin. Science 154, 1667-1668 (1966).

HANKA, L.J.; D.G.MARTIN & L.M.REINECKE: Two new antimetabolites of biotin: α-Methyldethiobiotin and α-methylbiotin. Antimicrob. Agents Chemother. 1, 135-138 (1972).

HENRY, W. (1803): PHIL. Trans. R. Soc. 93, 274-303.

HIGGINS, C.F. & M.M.HARDIE: Periplasmic protein associated with oligopeptide permeases of Salmonella typhimurium and Escherichia coli. J.Bacteriol. 155, 1434-1438 (1983).

HOCHSTER, R.M. & J&H.QUASTEL: Metabolic inhibitors, a comprehensive treatise, Vol. 1. New York: Academic Press (1963).

HOCKENHULL, D.J.D.: Production of antibiotics by fermentation. In: Essays in Applied Microbiology. NORRIS, J. & M.H.RICHMOND (Eds.). Chichester, New York, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons (1981).

HOTTA, K.; T.KITAHARA & Y.OKAMI: Studies on the mode of action of amiclenomycin. J. Antibiot. 28, 222-228 (1975).

HÜTTER, R.: Systematik der Streptomyceten. Basel: Karger Verlag (1967).

HÜTTER, R.; H.ZÄHNER & K.KELLER-SCHIERLEIN: Scopamine. Arch. Mikrobiol. 51, 1-8 (1956).

IUPAC - IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature: Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. Biochem. J. 219, 345-373 (1984).

IWAHARA, S. & Y.KANEMARU: Biosynthesis of biotin from dethiobiotin by intact cells of biotin-producing bacterium. Agric. Biol Chem. 39, 779-784 (1975).

IWAI, Y. & S.ŌMURA: Culture conditions for screening of new antibiotics. J.Antibiot. 35, 123-141 (1982).

IZUMI, Y.; H.MORITA, Y.TANI & K.OGATA: Partial purification and some properties of 7-keto-8-aminopelargonic acid synthetase, an enzyme involved in biotin biosynthesis. Agr. Biol. Chem. 37, 1327-1333 (1973).

JOHNSON, R.B.; S.KOHL, K.H.WIESMÜLLER, G.JUNG & W.G. BESSLER: Synthetic analogues of the N-terminal lipid part of bacterial lipoprotein are lymphocyte-B mitogens invitro and invivo. Immunbiology 165, 27-36 (1983).

KADNER, R.J.: Transport of vitamins and antibiotics. In: Bacterial transport. ROSEN, B.P. (Ed.), New York (1978).

KARUBE, I.; S.SUZUKI & E.J.VANDAMME: Antibiotic production with immobilized living cells. In: Biotechnology of industrial antibiotics. (Drugs and the pharmaceutical sciences, Vol 22), VANDAMME, J. (Ed.). New York, Basel: Dekker (1984).

KATZ, E. & A.L.DEMAIN: The peptide antibiotics of bacillus: Chemistry, biogenesis and possible function. Bact. Rev. 41, 449-474 (1977).

KAWASHIMA, M.; A.MIYAKE, T.HEMMI & S.FUJII: Biochemical studies on Acidomycin. III. Antibiotin activity of acidomycin and its related compounds. Pharm. Bull. 4, 53-55 (1956).

KERN, A: Amiclenomycin-Peptide. Isolierung und Strukturaufklärung neuer Biotin-Antimetaboliten. Dissertation, Universität Tübingen (1983).

KERN, A: persönliche Mitteilung (1984).

KITAHARA, T.; K.HOTTA, M.YOSHIDA & Y.OKAMI: Biological studies on Amiclenomycin. J. Antibiot. 28, 215-221 (1974).

KLEINKAUF, H. & KOISCHWITZ, H.: Lipmann Symposium: Energy, biosynthesis, and regulation in molecular biology. RICHTER, D. (Ed.). Berlin: De Gruyter (1974).

KÖGL, F. & B.TÖNNIS: Über das Bios-Problem. Darstellung von kristallisiertem Biotin aus Eigelb. Hoppe Seyl. Z. Physiol. Chem. 242, 43-73 (1936).

KOROBKOVA, T.P.; L.P.TEREKHOVA & T.S.MAKSIMOVA: Occurrence of antibiotics possessing properties of leucine antimetabolites. Antibiotiki (Moscow) 15, 936-940 (1970).

KURAHASHI, K.: Biosynthesis of peptide antibiotics. In: Antibiotics IV, Biosynthesis. CORCORAN, J.W. (Ed.). Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag (1981).

DeLANGE, R.J & T.S.HUANG: Egg white avidin. III. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. J. Biol. Chem. 246, 698-709 (1971).

LEBEK, G.: Die infektiöse, bakterielle Antibiotikaresistenz. Bern, Stuttgart: Hans Huber Verlag (1969).

LOEFFLER, W.: persönliche Mitteilung (1982).

LOEFFLER, W.: persönliche Mitteilung (1983).

MALIK, V.S.: Genetics and biochemistry of secondary metabolism. Adv. Appl. Microbiol. 28,27-115 (1982).

MARTIN, J.F.: Phosphate regulation of gene expression in candicidin biosynthesis. In: Microbiology 1976. SCHLESSINGER, D. (Ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology (1976).

MARTIN, J.F.: Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng. 6,105-127 (1977).

MARTIN, J.F.: Manipulation of gene expression in the developmemt of antbiotic production. In: Antibiotics and other secondary metabolites, pp. 19-37. HÜTTER,R.; T.LEISINGER, J.NÜESCH & W.WEHRLI (Eds.). London, New York, San Franzisco: Academic Press (1978).

MARTIN, J.F. & Y.AHARONOWITZ: Regulation of ß-lactam antibiotics. In: Antibiotics containing the ß-lactam structure. DEMAIN, A.L. & N.A.SOLOMON (Eds.). Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag (1983).

MARTIN, J.F. & McDANIEL, L.E.: The submerged culture production of the polyene antifungal antibiotics candidin and candihexidin. Dev. Ind. Microbiol. 15, 324-337 (1974).

MARTIN, J.F. & A.L.DEMAIN: Control by phosphate of candicidin production. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1103-1109 (1976).

MARTIN,. J.F. & A.L.DEMAIN: Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. 44, 230-251 (1980).

MOORE, G.E.; R.E.GERNER & H.A.FRANKLIN: Culture of normal human leucocytes. J. Am. Med. Assoc. 199, 87-92 (1967).

MORLEY, J.S.; J.W.PAYNE & T.D.HENNESSEY: Antibacterial activity and uptake into Escherichia coli of backbone modified analogues of small peptides. J. Gen. Microbiol. 129, 3701-3708 (1983).

MOSS, J. & M.D.LANE: The biotin dependent enzymes. Adv. Enzymol. 35, 321-442 (1971).

NIKAIDO, H. & T.NAKAE: The outer membrane of gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. 20, 163-250 (1979).

NONOMURA, H.: Key for classification and identification of 458 species of the streptomycetes included in ISP. J. Ferment. Technol. 52, 78-92 (1974).

OGATA, K.; Y.IZUMI & Y.TANI: Biosynthesis of biotin-vitamers from glutaric acid, a new biotin precursor. Agr. Biol. Chem. 37, 1087-1092 (1972).

OKAMI, Q.; T.KITAHARA, M.HAMADA, H.NAGANAWA, S.KONDO, K.MAEDA, T.TAKEUCHI & H.UMEZAWA: Studies on a new amino acid antibiotic, amiclenomycin. J. Antibiot. 27, 656-664 (1974).

ŌMURA, S.; Y.TANAKA, C.KITAO, H.TANAKA & Y.IWAI: Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. Antimicrob. Agents Chemother. 18, 691-695 (1980).

PIRT, S.J.: Principles of microbe and cell cultivation. Oxford: Blackwell Scientific Publishers (1975).

PAYNE. J.W.: Peptide transport in Escherichia coli: Permease specifity towards terminal amino group substituents. J. Gen. Microbiol. 80, 269-276 (1974).

PAYNE, J.W.: Peptides in microorganisms. Adv. Microbiol. Physiol. 13, 55-113 (1976).

PAYNE, J.W.: Transport and hydrolysis of peptides by microorganisms. In: Peptide transport and hydrolysis. CIBA Foundation Symposia Vol. 50. Amsterdam: Associated Scientific Publishers (1977).

PAYNE, J.W.: Transport and utilization od peptides by bacteria. In: Microorganisms and nitrogen sources. PAYNE, J.W. (Ed.). Chichester, New York, Brisbane, Toronto: J.WILEY & SONS (1980a).

PAYNE, J.W.: Energetics of peptide transport in bacteria. In: Microorganisms and nitrogen sources. PAYNE, J.W. (Ed.). Chichster, New York, Brisbane, Toronto: J.Wiley & SONS (1980b).

PAYNE, J.W. & C.GILVARG: Transport of peptides in bacteria. In: Bacterial Transport, ROSEN, B.P. (Ed.). New York, Basel: Marcel Dekker (1978).

POETSCH, M.: Optimierung der Fermentation eines Vitamin E-Antagonisten. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1982).

PRIDHAM, T.G. & D.GOTTLIEB: The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. J. Bacteriol. 56, 107-114 (1948).

PRIDHAM, T.G. & H.D.TRESNER: Streptomycetaceae. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., BUCHANAN, R. & N.GIBBONS (Eds.). Baltimore: Williams & Wilkins Comp. (1974).

PRUESS, D.L.; J.P.SCANNELL, H.A.AX, M.KELLETT, F.WEISS, T.C.DEMNY & A.STEMPEL: Antimetabolites produced by microorganisms. L-(N^5-Phosphono)methionine-S-sulfoximinyl-L-alanyl-L-alanine. J.Antibiot. 26, 261-266 (1973).

PRUESS, D.L. & J.P.SCANNEL: Antimetabolites from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 17, 19-62 (1974).

RINGROSE, P.S.: Peptides as antimicrobial agents. In: Microorganisms and nitrogen sources. PAYNE, J.W. (Ed.). Chichester, New York, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons (1980).

RAGAN, C.M. & L.C.VINING: Intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and streptomycin production in cultures of Streptomyces griseus. Can. J. Microbiol. 24, 1012-1015 (1978).

ROSEN, B.P.: Basic amino acid transport in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 246, 3653-3662 (1971).

ROSEN, B.P.: Basic amino acid transport in Escherichia coli. II. Purification and properties of an arginine-specific binding protein. J. Biol. Chem. 248, 1211-1218 (1973).

ROTH, K.S.: Biotin in clinical medicine - a review. Am. J. Clin. Nutr. 34, 1967-1974 (1981).

RUBIN, S.H. & J.SCHEINER: Antibiotin effect of homologs of biotin and biotin sulfone. Arch. Biochem. 23, 400-410 (1949).

RUTTLOFF, H.; J.HUBER, F.ZICKLER & K.H.MANGOLD: Biometrische Versuchsplanung. In: Industrielle Enzyme. Darmstadt: Steinkopf Verlag (1979).

SCHÖNBECK, F.; H.W.DEHNE & H.BALDER: The efficiency of induced resistance under practical culture conditions. 1. Powdery mildew of grape cucumber and wheat. Z. Pflanzenk. 89, 177-184 (1982).

SEQUEIRA, L.: Mechanisms of induced resistance in plants. Ann. Rev. Microbiol. 37, 51-81 (1984).

SHIER, W.T.; K.L.RINEHART & D.GOTTLIEB: Preparation of four new antibiotics from a mutant of Streptomyces fradiae. Nat. Acad. Sci. 63, 198-204 (1969).

SHIRLING, E.B. & D.GOTTLIEB: Methods for characterization of Streptomyces species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16, 313-340 (1966).

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Heidelberg: Springer Verlag (1967).

STAPLEY, E.O.; J.M.MATA, I.M.MILLER, T.C.DEMNY & H.R.WOODRUFF: Antibiotic MSD-235. I. Production by Streptomyces avidinii and Streptomyces lavendulae. Antimicrob. Agents Chemother. 1963, 20-27 (1963).

STAPLEY, E.O.; T.C.DEMNY, A.K.MILLER & H.B.WOORUFF: Histomycin. I. Production by Nocardia histidans and biological characterization. Antimicrob. Agents Chemother. 1966, 595-602 (1967).

STONER, G.L. & M.A.EISENBERG: Purification and properties of 7,8-diaminopelargonic acid aminotransferase. J. Biol. Chem. 250, 4029-4036 (1975).

TEJMAR-KOLAR, L.: persönliche Mitteilung (1984).

TEJMAR-KOLAR, L. & H.ZÄHNER: Search for effective substances against parasitic protozoa: An attempt to develop a new screening model. FEMS Microbiol. Lett. 24, 21-24 (1984).

TAUSIG, F. & F.J.WOLF: Streptavidin - a substance with avidin-like properties produced by microorganisms. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 205-209 (1964).

UMEZAWA, H.: Enzyme inhibitors of microbial origin. Tokyo: Univ. Yokyo. (1972).

UMEZAWA, H.: Recent advances in bioactive microbial secondary metabolism. Jap. J. Antibiot. 30, Suppl., 138-163 (1977).

UMEZAWA, H.: Low-molecular-weight enzyme inhibitors of microbial origin. Ann. Rev. Microbiol. 36, 75-99 (1982).

UMEZAWA, H.; T.AOYAGI, H.SUDA, M.HAMADA & T.TAKEUCHI: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by Actinomycetes. J. Antibiot. 29, 97-99 (1976).

VANEK, Z.; J.CUDLIN, M.BLUMAUEROVA & Z.HOSTALEK: How many genes are required for the synthesis of chlortetracycline? Folia Microbiol. 16, 225-240 (1971).

WANG, D.I.C.; C.L.COONEY, A.L.DEMAIN, P.DUNNHILL, A.E.HUMPHREY & M.D.LILLY: Fermentation and enzyme technology. New York: John Wiley & Sons (1979).

WEBER, F. & B.PFISTER: Beziehungen zwischen den Vitaminen E, K und den Ubichinonen. In: Fermente, Hormone, Vitamine. AMMON, R. & W.DIRSCHERL (Eds.), Bd. III,3. Stuttgart, New York: Thieme Verlag (1982).

WEINBERG, E.D.: Secondary metabolism: Control by temperature and inorganic phosphate. Dev. Ind. Microbiol. 15, 70-81 (1974).

WEINBERG, E.D.: Biosynthesis of microbial metabolites - regulation by mineral elements and temperature. In: Overproduction of microbial products, pp. 181-194, KRUMPHANZEL, V.; B.SIKYTA & Z.VANEK (Eds.). London, New York, Paris, San Diego, San Franzisco, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press (1982).

WERNER, R.G.: persönliche Mitteilung (1983).

WOLFINBARGER, L. & G. MARZLUF: Specifity of peptide transport in Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys. 171, 637-644 (1975).

WOLFINBARGER, L.: Transport and utilization of peptides by fungi. In: Microorganisms and nitrogen sources. PAYNE, J.W. (Ed.). Cichester, New York, Brisbane, Toronto: J.WILEY & SONS, (1980).

WOOLLEY, D.W.: A study of Antimetabolites. New York: J.Wiley & Sons, 1952.

WOOLLEY, D.W.: Antimetabolite wasserlöslicher Vitamine. In: Metabolic inhibitors, HOCHSTER, R.M. & J.H.QUASTEL (Eds.), Vol. 1, pp. 445-480. New York: Academic Press, (1963).

ZÄHNER, H.: Einige Aspekte der Antibiotika Forschung. Angew. Chem. 89, 696-703 (1977).

ZÄHNER, H.: The search for new secondary metabolites. In: Antibiotics and other secondary metabolites. HÜTTER, R.; T.LEISINGER, J. NÜESCH & W.WEHRLI (Eds.). London, New York, San Franzisco: Academic Press (1978).

ZÄHNER, H.: What are secondary metabolites? Folia Microbiol. 24, 435-443 (1979).

ZÄHNER, H.: Antibiotika und andere sekundäre Metabolite In: Handbuch der Biotechnologie. FAUST, U.; W.SITTIG & D.A.SUKATSCH (Eds.). Wiesbaden: Akademische Verlagsgesellschaft (1982).

ZÄHNER, H. & L.ETTLINGER: Zur Systematik der Actinomyceten. 3. Die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen als Hilfsmittel der Artbestimmung innerhalb der Gattung Streptomyces. Arch. Mikrobiol. 26, 307-328 (1957).

ZÄHNER, H.; R.HÜTTER & E.BACHMANN: Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Ach. Mikrobiol. 36, 325-349 (1960).

ZÄHNER, H & W.K.MAAS: Biology of Antibiotics. Berlin: Springer Verlag (1972).

ZÄHNER, H.; H.DRAUTZ & W.WEBER: Novel aproaches to metabolite screening. In: Bioactive microbial products: Bu'LOCK, NISBET, WINSTANLEY (Eds.) London, New York: Academic Press (1982).

ZÄHNER, H. & R.KURTH: Overproduction of microbial metabolites. The supply of precursors from the intermediary metabolism. In: Overproduction of microbial products. KRUMPHANZEL, V.; B.SIKYTA & Z.VANEK (Eds.). London, New York, Paris, San Diego, San Franzisco, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press (1982).

Lebenslauf

03.07.1955	geboren in Hannover
1962 - 1966	Grundschule in Kirchwehren
1966 - 1974	Humboldt - Gymnasium in Hannover
13.05.1974	Reifeprüfung
01.10.1974 - 31.12.1975	Wehrdienst
SS 1976	Chemie - Studium an der Technischen Universität Braunschweig
ab WS 1976	Biologie - Studium an der Technischen Universität Braunschweig
09.10.1978	Diplomvorprüfung in Biologie
ab SS 1979	Biologie - Studium an der Eberhard - Karls - Universität Tübingen
Oktober 1981 - September 1982	Diplomarbeit am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Prof. Dr. H.Zähner mit dem Thema: "Optimierung der Fermentation eines Vitamin E - Antagonisten"
21.10.1982	Diplomhauptprüfung in Biologie
	anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am oben angegebenen Lehrstuhl unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner

Meine akademischen Lehrer waren

in Braunschweig:

B. Biehl, H.J. Bogen, H. Cammenga, G. Döge, G. Fellenberg,
O. von Frisch, H. Gutz, C. Hauenschild, H.H. Inhoffen,
K. Kerl, W. Kreiser, G. Kurth, F. Münnich, R. Näveke,
E.M. Neuber, H. Reichenbach, G. Rüppell, R. Schmutzler,
C. Schwink, F. Wagner, K. Wagner.

in Tübingen:

D. Ammermann, C.F. Bardele, W. Bessler, V. Braun, W. Engels,
H. Erkert, H. Gaude, H.J. Gerth, K. Hantke, W. Harder,
V. Hemleben, D. Mecke, K. Poralla, E. Sander, W. Schwoebel,
W. Seyffert, K. Strohmaier, G. Winkelmann, H. Zähner.

Druck und Verarbeitung: Dissertationsdruck Darmstadt, Tel. 06151/21253